

ФАРМАКОЛОГИЯ НОВОГО АНКСИОЛИТИКА АФОБАЗОЛА

НЕЙРОРЕЦЕПТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ АФОБАЗОЛА

С. Б. Середенин, М. В. Воронин¹

Выполнен радиолигандный анализ взаимодействия афобазола {5-этокси-2-[2-(морфолино)-этилтио] бензимидазола дигидрохлорид} и его основного метаболита М-11 {2-[2-(3-оксоморфолин-4-ил)-этилтио]-5-этоксibenзимидазола гидрохлорид} с нейрорецепторами. Установлено взаимодействие афобазола с σ_1 (sigma 1) ($K_i = 5,9 \cdot 10^{-6}$ М), MT_1 ($K_i = 1,6 \cdot 10^{-5}$ М), MT_3 ($K_i = 9,7 \cdot 10^{-7}$ М) рецепторами, регуляторным участком МАО-А ($K_i = 3,6 \cdot 10^{-6}$ М). Выявлены лигандные свойства М-11 по отношению к MT_3 рецепторам ($K_i = 3,9 \cdot 10^{-7}$ М). Методом конфокальной микроскопии показана транслокация σ_1 -рецептора из эндоплазматического ретикулума в область наружной мембраны на модели иммортализованных клеток гиппокампа НТ-22 после 30 и 60 мин инкубации с афобазолом в концентрации 10^{-8} М. Установлено, что афобазол является обратимым ингибитором МАО-А. Полученные данные соответствуют ранее зарегистрированным анксиолитическим и нейропротекторным свойствам афобазола.

Ключевые слова: афобазол, σ_1 -рецептор, мелатониновые рецепторы, МАО-А, радиолигандное связывание, иммунофлюоресценция

ВВЕДЕНИЕ

Афобазол — оригинальный селективный анксиолитик, разработан и внедрен в медицинскую практику ГУ НИИ им. В. В. Закусова РАМН в сотрудничестве с ЗАО Мастер Фарм (Рег. № ЛС-000861 от 03.11.2005). Механизм анксиолитического действия афобазола основан на его способности предотвращать стрессиндуцированное падение связывания в бензодиазепиновом участке ГАМК_A-рецептора [5]. Вместе с тем попытки обнаружить связывание афобазола с ГАМК_A-рецепторным комплексом дали отрицательные результаты [6]. Таким образом, восстановление функций указанного рецептора следует рассматривать в качестве результирующего эффекта предшествующих нейрохимических событий. Не менее важным свойством афобазола оказалось его нейропротекторное действие, установленное в опытах *in vitro* и *in vivo* [1, 2], первичные механизмы которого оставались также невыясненными. Поэтому целью настоящей работы явилось изучение связывания афобазола и его основного метаболита М-11 [4] с рецепторами, отобранными в качестве кандидатов для исследования на основе теоретического анализа фармакологических эффектов препарата. Работа выполнена в компании “Сереp” (Франция).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Препараты. Субстанции афобазола и метаболита М-11 (рис. 1) синтезированы в ГУ НИИ фармакологии РАМН. Препараты исследовали в диапазоне концентраций 10^{-3} М – 10^{-9} М.

Радиолигандный анализ. Способность афобазола и М-11 вытеснять высокоаффинные лиганды нейрорецепторов из мест связывания изучена в соответствии с протоколами компании Сerep (<http://www.cerep.com>). Перечень отобранных для исследования рецепторов приведен в табл. 1.

Представляется целесообразным привести более подробное описание радиолигандных методов оценки

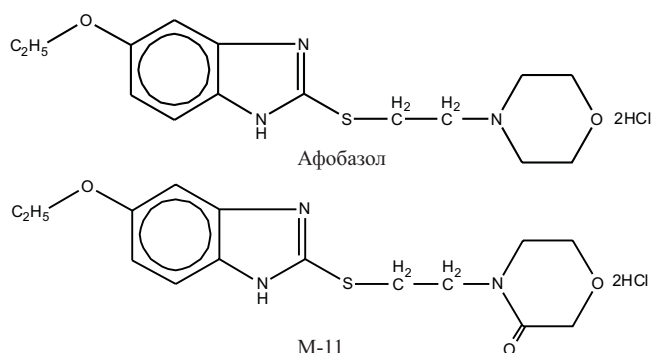


Рис. 1. Структурная формула афобазола {5-этокси-2-[2-(морфолино)-этилтио] бензимидазола дигидрохлорид} и его основного метаболита М-11 {2-[2-(3-оксоморфолин-4-ил)-этилтио]-5-этоксibenзимидазола гидрохлорид}.

¹ Лаборатория фармакогенетики (руководитель — акад. РАМН С. Б. Середенин) ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

Таблица 1. Рецепторы, отобранные для изучения параметров связывания с афобазолом и М-11

Типы рецепторов	Лиганд
<i>Непептидные рецепторы</i>	
A ₁ , A _{2A} , A _{2B} , A ₃	Аденозин
σ ₁ , α ₂ , β ₁ , β ₂ , β ₃	Адреналин
BZD	Бензодиазепины (центральные рецепторы)
D1, D2S, D2L, D3, D4, D5	Дофамин
GABA _A , GABA _B (1b)	ГАМК (γ-аминомасляная кислота)
AMPA, Kainate, NMDA, Glycine (стрихнин-нечувствительный), PCP	Глутамат
H ₁ , H ₂ , H ₃ , H ₄	Гистамин
LPA ₁ (Edg-2)	Липофосфолипиды
MT ₁ , MT ₂ , MT ₃ (ML ₂)	Мелатонин
M ₁ , M ₂ , M ₃ , M ₄ , M ₅	Мускарин
α4 нейрональный α-BGTX-нечувствительный (α4β2), α7 нейрональный α-BGTX-чувствительный	Никотин
P2X, P2Y	Пурины
5-HT _{1A} , 5-HT _{1B} , 5-HT _{1D} , 5-HT _{2A} , 5-HT _{2B} , 5-HT _{2C} , 5-HT ₃ , 5-HT _{4e} , 5-HT _{5A} , 5-HT ₆ , 5-HT ₇	Серотонин
σ ₁ , σ ₂ (+)-пентазоцин, нейростероиды	Сигма-рецепторы
<i>Пептидные рецепторы</i>	
AT ₁ , AT ₂	Ангиотензин
CCK ₁ , CCK ₂	Холестоксинин
CRF ₁	Кортикотропин рилизинг фактор
GAL ₁ , GAL ₂	Галанин
NK ₁ , NK ₂ , NK ₃	Нейрокинин
Y ₁ , Y ₂	Нейропептид Y
Неселективная рецепция нейротензина, NTS1	Нейротензин
Неселективная рецепция налоксона, δ ₂ (delta opioid receptor), μ (mu opioid receptor)	Опиоиды и опиоидоподобные вещества
Неселективная рецепция соматостатина (SST рецепторы)	Соматостатин
V1a, V1b, V2	Вазопрессин
<i>Рецепторы стероидных гормонов</i>	
GR	Глюкокортикоиды
PR	Прогестерон
<i>Рецепторы ферментов метаболизма моноаминов</i>	
MAO-A	Хлоргилин
MAO-B	(R)-депренил
<i>Рецепторы ионных каналов</i>	
Потенциалчувствительный Ca ²⁺ канал	
Ca _v 1.1 (L-тип)	Дилтиазем
Потенциалчувствительный K ⁺ канал K _{IR} 6 (K _{ATP})	Глибенкламид
ГАМК чувствительный Cl ⁻ канал	Пикротоксин
<i>Рецепторы транспортеров моноаминов и аминокислот</i>	
Транспортер аденозина	NBTI
Транспортер норадреналина (NET)	Низоксетин
Транспортер дофамина (DAT)	ВТСР
Транспортер ГАМК (GAT)	ГАМК
Транспортер холина (CHT)	Гемихолин
Транспортер серотонина (SERT)	Имипрамин

взаимодействия с рецепторами, по которым получены позитивные результаты.

Взаимодействие афобазола и М-11 с σ₁ (sigma 1) рецепторами изучали на клеточной линии человека Jurkat [20]. В качестве меченого лиганда использовали [³H](+)-пентазоцин в концентрации 8 нМ. Препаратом сравнения служил галоперидол (IC₅₀ = 2,2 · 10⁻⁸ М,

Ki = 1,3 · 10⁻⁸ М, nH = 1,2). Неспецифическое связывание определяли в присутствии 10 мкМ галоперидола. Время инкубации с клеточной линией составляло 120 мин при температуре 22°C.

Взаимодействие веществ с MT₃ (ML₂) рецепторами изучали на ткани мозга сирийского хомяка [49] с применением [¹²⁵I]2-йодомелатонина в концентрации

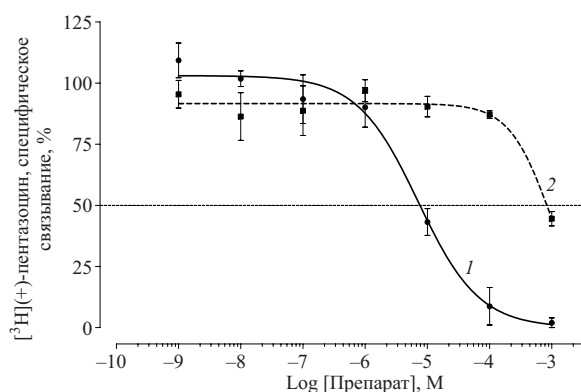


Рис. 2. Взаимодействие афобазола с σ_1 -рецептором. Для афобазола $IC_{50} = 7,1 \cdot 10^{-6}$ М, $K_i = 5,9 \cdot 10^{-6}$ М, $nH = 0,9$. Для М-11 $IC_{50} = 9,6 \cdot 10^{-4}$ М, $K_i = 7,9 \cdot 10^{-4}$ М, $nH = 1,3$. Связывание афобазола с σ_1 -рецептором определялось в двух повторениях для каждой концентрации. Здесь и на рис. 3 – 5 данные представлены в виде $M \pm S. E. M.$ 1 — афобазол, 2 — М-11.

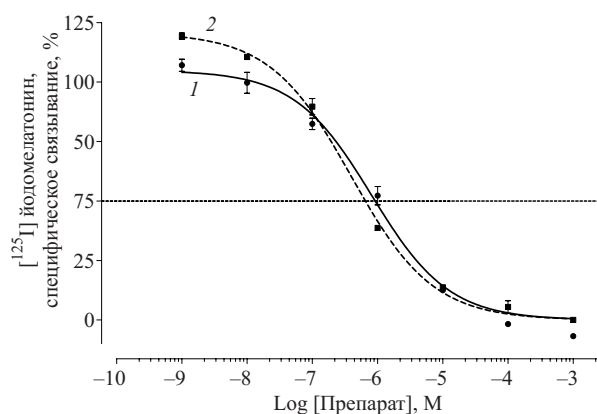


Рис. 3. Взаимодействие афобазола с MT_3 рецептором. Для афобазола $IC_{50} = 9,9 \cdot 10^{-7}$ М, $K_i = 9,7 \cdot 10^{-7}$ М, $nH = 0,8$. Для М-11 $IC_{50} = 4,0 \cdot 10^{-7}$ М, $K_i = 3,9 \cdot 10^{-7}$ М, $nH = 0,7$. Связывание афобазола с MT_3 рецептором определялось в двух повторениях для каждой концентрации. Остальные обозначения те же, что на рис. 2.

0,1 нМ. В качестве вещества сравнения использовали мелатонин ($IC_{50} = 6,2 \cdot 10^{-8}$ М, $K_i = 6,1 \cdot 10^{-8}$ М, $nH = 1,1$). Неспецифическое связывание определяли в присутствии 30 мкМ мелатонина. Инкубация с образцами ткани мозга длилась 30 мин при температуре 4 °С.

Взаимодействие веществ с рекомбинантными MT_1 -рецепторами человека изучали на овариальной клеточной линии китайского хомяка (СНО клетки) [64]. В качестве меченого лиганда использовали $[^{125}I]2$ -йодомелатонин в концентрации 0,025 нМ. В качестве вещества сравнения использовали мелатонин ($IC_{50} = 2,6 \cdot 10^{-10}$ М, $K_i = 1,6 \cdot 10^{-10}$ М, $nH = 1,2$). Неспецифическое связывание определяли в присутствии 1 мкМ мелатонина. Время инкубации с клеточной линией составляло 60 мин при температуре 22 °С.

Взаимодействие веществ с моноаминоксидазой-А (МАО-А) изучали на ткани коры большого мозга крыс [12, 16]. В качестве меченого лиганда использовали $[^3H]Ro$ 41-1049 в концентрации 10 нМ. Веществом сравнения служил ингибитор МАО-А хлоргилин ($IC_{50} = 2,7 \cdot 10^{-9}$ М, $K_i = 1,6 \cdot 10^{-9}$ М, $nH = 1,6$). Неспецифическое связывание определяли в присутствии 1 мкМ хлоргилина. Инкубация с образцами коры большого мозга крыс длилась 60 мин при температуре 37 °С.

Величины IC_{50} и коэффициент Хилла (nH) были определены с использованием нелинейного регресси-

онного анализа кривых конкурентного вытеснения с аппроксимацией кривой уравнением Хилла. Величину K_i рассчитывали согласно уравнению Ченга — Прусоффа [14].

В радиолигандных исследованиях было обнаружено связывание с σ_1 -рецепторами, поэтому исходя из литературных данных о транслокации σ_1 -рецепторов при взаимодействии с лигандами из мембран эндоплазматического ретикула в область наружной мембраны клетки, проведено исследование эффектов афобазола методом конфокальной микроскопии с иммунофлуоресцентным окрашиванием [46].

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Способность афобазола вызывать транслокацию σ_1 -рецептора в направлении внешней мембраны нейронов изучена с применением иммунофлуоресценции на модели иммортализованных клеток гиппокампа НТ-22. Афобазол вносили в среду культивирования в конечной концентрации 10^{-8} М, обладавшей нейропротекторным действием на моделях окислительного стресса и глутаматной токсичности [2]. Клетки фиксировали через 30 мин и через 1 ч после внесения афобазола 4 % параформальдегидом в течение 10 мин. Далее клетки отмывали раствором PBS 4 раза по 10 мин. После этого клетки обрабатывали согласно протоколу М. Р. Morin-Surun и соавт. 250 мМ раствором сахарозы в течение 36 ч при температуре 4 °С и затем 1 мг/мл BSA в течение 2 ч при комнатной температуре [46]. Для

Таблица 2. Влияние преинкубации митохондрий с афобазолом на активность МАО-А митохондрий печени крысы

Условия эксперимента	Афобазол (1 мМ)	Афобазол (0,1 мМ)
Активность МАО-А без преинкубации, % от исходной активности	58 ± 4	41 ± 6
Активность МАО-А с преинкубацией (30 мин), % от исходной активности	46 ± 4	36 ± 10
Уровень значимости (<i>p</i>)	> 0,05	> 0,05

Примечание. Указана активность МАО-А, полученная в результате 4–7 независимых экспериментов и выраженная в процентах по отношению к контролю. Данные представлены в виде $M \pm S. E. M.$ Статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия для зависимых выборок.

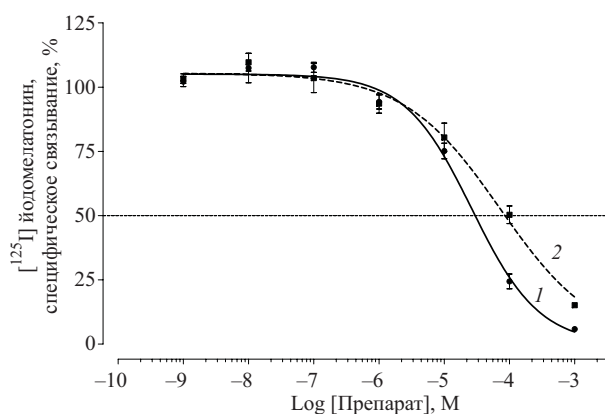


Рис. 4. Взаимодействие афобазола с MT_1 рецептором. Для афобазола $IC_{50} = 2,7 \cdot 10^{-5}$ М, $K_i = 1,6 \cdot 10^{-5}$ М, $nH = 0,8$. Для М-11 $IC_{50} = 7,2 \cdot 10^{-5}$ М, $K_i = 4,4 \cdot 10^{-5}$ М, $nH = 0,6$. Связывание афобазола с MT_1 рецептором определялось в двух повторениях для каждой концентрации. Остальные обозначения те же, что на рис. 2.

двойного иммунофлуоресцентного окрашивания использовали антитела к σ_1 -рецепторам фирмы “Santa Cruz Biotechnology” и антитела к кальнексину (белок, ассоциированный с мембраной эндоплазматического ретикулума) фирмы “Abcam” в растворе PBS с BSA (1 мг/мл). Инкубацию с первыми антителами проводили в течение 12 ч при 4°C , со вторыми — в течение 1 ч при комнатной температуре.

Изучение активности MAO-A. Влияние афобазола на активность MAO-A исследовали на митохондриях мозга и печени крыс. Митохондрии мозга и печени крыс выделяли методом дифференциального центрифугирования как описано ранее [44]. Активность MAO-A определяли радиометрическим методом, используя 0,1 мМ [^{14}C]серотонин креатининсульфат в качестве субстрата. Обратимость действия афобазола изучали согласно методике, опубликованной ранее [3]. Статистический анализ проводили с использованием t-критерия для зависимых выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате радиолигандного анализа обнаружена группа рецепторов-мишеней афобазола. К их числу относятся: σ_1 рецептор, рецепторы мелатонина MT_1 и MT_3 (ML_2) и регуляторный участок MAO-A. Основным метаболит афобазола М-11 проявил значимое сродство только к MT_3 и MT_1 рецепторам.

При вытеснении из мест связывания агониста σ_1 -рецепторов [^3H](+)-пентазоцина в концентрации 8 нМ величины IC_{50} , K_i и nH для афобазола составили $7,1 \cdot 10^{-6}$ М, $5,9 \cdot 10^{-6}$ М и 0,9 соответственно (рис. 2). Величины IC_{50} и K_i для М-11 находятся в области высоких миллимолярных концентраций, что не позволяет сделать заключение о специфическом взаимодействии М-11 с данным типом рецептора.

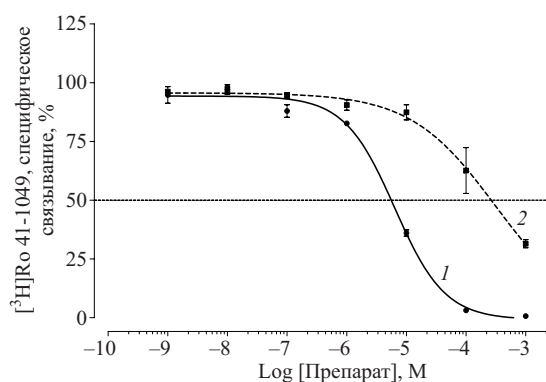


Рис. 5. Взаимодействие афобазола с MAO-A рецептором. Для афобазола $IC_{50} = 6,2 \cdot 10^{-6}$ М, $K_i = 3,6 \cdot 10^{-6}$ М, $nH = 1,1$. Связывание афобазола с MAO-A рецептором определялось в двух повторениях для каждой концентрации. Остальные обозначения те же, что на рис. 2.

Наибольшее сродство афобазола установлено для MT_3 (ML_2) рецептора: $IC_{50} = 9,9 \cdot 10^{-7}$ М, $K_i = 9,7 \cdot 10^{-7}$ М, $nH = 0,8$. MT_3 рецептор также оказался единственной обнаруженной мишенью основного метаболита афобазола — М-11: $IC_{50} = 4 \cdot 10^{-7}$ М, $K_i = 3,9 \cdot 10^{-7}$ М, $nH = 0,7$ (рис. 3). Полученные данные позволяют отнести афобазол и М-11 к группе высокоафинных лигандов MT_3 рецептора.

Афобазол и М-11 в микромолярном диапазоне концентраций взаимодействуют с мелатониновым рецептором 1-го типа (MT_1). Для афобазола $IC_{50} = 2,7 \cdot 10^{-5}$ М, $K_i = 1,6 \cdot 10^{-5}$ М, $nH = 0,8$. Для М-11 $IC_{50} = 7,2 \cdot 10^{-5}$ М, $K_i = 4,4 \cdot 10^{-5}$ М, $nH = 0,6$ (рис. 4) Однако афобазол обладает более высоким сродством к данному типу рецептора.

При изучении взаимодействия афобазола с регуляторным участком MAO-A установлены следующие параметры рецепторного взаимодействия: $IC_{50} = 6,2 \cdot 10^{-6}$ М, $K_i = 3,6 \cdot 10^{-6}$ М, $nH = 1,1$ (рис. 5). Значения параметров IC_{50} и K_i для М-11 находятся в области высоких концентраций ($IC_{50} = 3,1 \cdot 10^{-4}$ М, $K_i = 1,8 \cdot 10^{-4}$ М, $nH = 0,6$), что свидетельствует об отсутствии специфического взаимодействия.

В результате иммунофлуоресцентного окрашивания клеток гиппокампа мыши линии НТ-22 антителами к σ_1 и кальнексину установлено, что введение афобазола в среду культивирования вызывает внутриклеточное перераспределение σ_1 рецепторов. На рис. 6 видно, что в контроле σ_1 рецепторы отсутствуют в аксонах и локализованы в теле нейронов, а их расположение соответствует локализации маркера эндоплазматического ретикулума — кальнексина. Через 30 мин после внесения афобазола в среду культивирования окрашивание, специфичное для σ_1 рецепторов, наблюдается не только в теле нейронов, но и в аксонах. Через 1 ч после внесения афобазола видно, что данные рецепторы в значительной мере локализованы близ плазматической мембраны клеток, в том числе, аксонов, в то

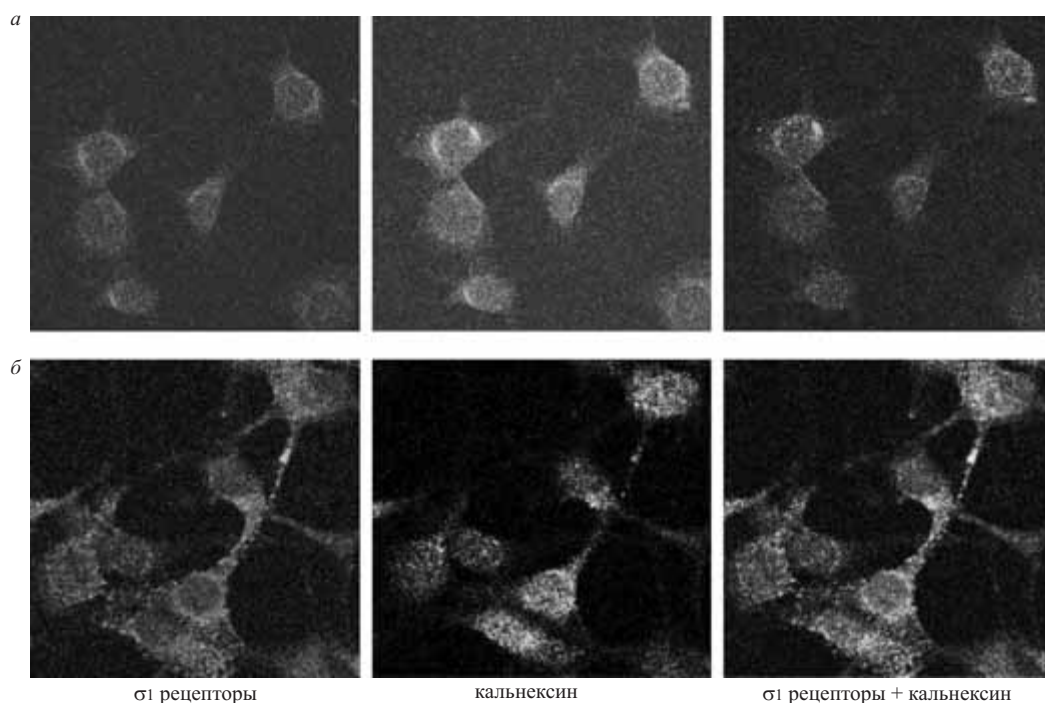


Рис. 6. Иммунофлуоресцентное окрашивание σ_1 -рецепторов и кальнексина в иммортализованных клетках гиппокампа мыши линии HT-22.

а — Контрольное окрашивание. *б* — Окрашивание через 1 ч после внесения афобазола в инкубационную среду в концентрации 10^{-8} М.

время как кальнексин по-прежнему остается ассоциированным с мембраной эндоплазматического ретикулума в теле нейронов.

В результате исследований, проведенных под руководством А. Е. Медведева, установлено, что афобазол снижает активность MAO-A митохондрий головного мозга и печени крыс (рис. 7). При этом преинкубация препарата с митохондриями печени в течение 30 мин не усиливала эффект препарата в опытах на митохондриях печени (табл. 2). Отсутствие зависимость от времени увеличения ингибирования MAO-A свидетельствует об обратимом взаимодействии афобазола с ферментом. Действительно, при преинкубации афобазола с митохондриями печени длительностью 30 мин с последующей трехкратной отмывкой митохондрий активность MAO-A восстанавливалась полностью (табл. 3).

Величины IC_{50} ингибирования MAO-A головного мозга $[(3,6 \pm 1,5) \cdot 10^{-4}$ М] и печени $[(4,3 \pm 1,1) \cdot 10^{-4}$ М] афобазолом, полученные в серии экспериментов, свидетельствует о том, что препарат проявляет свойства слабого легко обратимого ингибитора фермента.

Проведенное исследование определило в качестве первичных «мишеней» для афобазола σ_1 , MT_1 , MT_3 рецепторы и MAO-A. В доступной литературе мы не обнаружили сообщений о фармакологических препаратах либо химических соединениях с подобным спектром рецепторных взаимодействий.

Физиологическая роль выявленных молекулярных образований подробно охарактеризована в ряде обзоров и оригинальных статей [17, 23, 27, 38]. Наиболее важно, что эти данные согласуются с установленными ранее анксиолитическими и нейропротекторными эффектами афобазола [1, 2, 5, 52]. В обсуждении представляется целесообразным более подробно рассмотреть ряд следствий из зарегистрированных фактов связывания афобазола с σ_1 и MT_3 рецепторами, поскольку свойства MT_1 рецептора и обратимых ингибиторов MAO-A хорошо изучены.

σ_1 -Рецепторы. σ_1 -Рецепторы открыты в 1976 г. [40]. Выявление селективных лигандов, клонирование и определение аминокислотной последовательности рецептора позволили исключить его из ряда опиоидных рецепторов, к которым он первоначально был отнесен [22, 29, 54, 59].

Предполагается, что σ_1 рецептор локализуется преимущественно на эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) и имеет два трансмембранных домена [8, 46]. Удивительным и вероятно весьма важным свойством σ_1 -рецептора является способность к миграции в область поверхностной мембраны клетки в составе липидных микродоменов (*lipid rafts*) [24]. Липидное окружение σ_1 -рецептора представлено сфинголипидами и холестерином, служащими каркасом для локализованных в наружной мембране белков рецепторов, ионных каналов ферментов [25]. Таким образом, логично полагать, что инициированный афобазолом

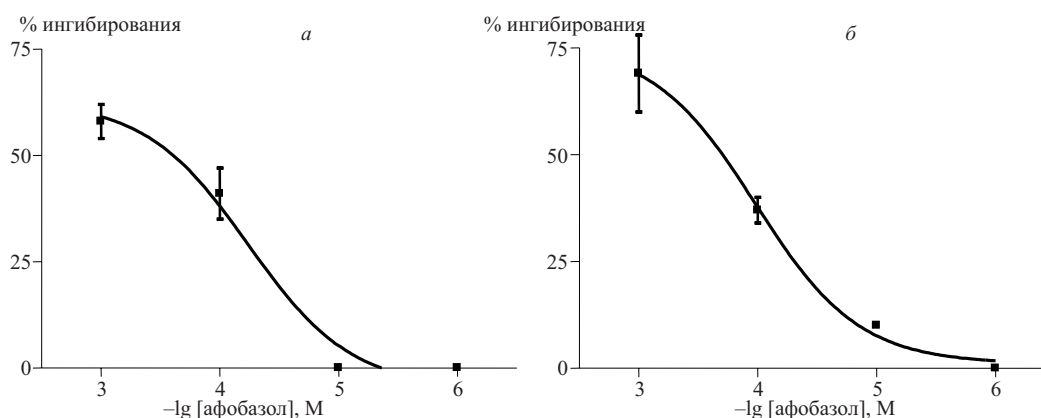


Рис. 7. Влияние афобазола на активность MAO-A печени (а) и головного мозга (б) крысы. Влияние афобазола на активность фермента исследовали без предварительной преинкубации митохондрий с препаратом. Данные шести независимых экспериментов – а и трех независимых экспериментов – б представлены в виде $M \pm S. E. M.$

транспорт σ_1 рецептора в область наружной мембраны может способствовать восстановлению фосфолипидного состава клеточных мембран, который, как известно, нарушается при патологических процессах в результате усиления перекисных реакций [21]. В свою очередь это должно нивелировать зависимость от ПОЛ нарушения конформации функционально важных белков и нормализовать их активность, что и было установлено для ГАМК_A-рецептора в опытах с афобазолом *ex vivo* [5].

Далее, σ_1 -рецептор способен к белок-белковым взаимодействиям и рассматривается в ряде случаев в качестве шаперона [23, 26]. Установлено взаимодействие σ_1 -рецепторов с белком цитоскелета анкирином, связанным с рецептором инозитол 1,4,5-трифосфата (IP3R), благодаря чему регулируется IP3 зависимое высвобождение Ca^{2+} из ЭПР [45]. σ_1 -Рецептор обнаружен также в мембранах ЭПР, ассоциированных с митохондриями, где взаимодействует с белком BiP, пролонгируя выход Ca^{2+} из ЭПР в митохондрии, увеличивая таким образом биоэнергетический потенциал нейронов [26]. Активация σ_1 -рецепторов опосредует регуляцию потенциалзависимых ионных каналов наружной мембраны [8] и транспорт Ca^{2+} через

NMDA-рецепторы [41, 67]. σ_1 -Рецептор способен ингибировать пресинаптическое высвобождение глутамата и глутаматиндуцируемую NO синтазу [34, 37, 61]. За счет белок-белковых взаимодействий σ_1 -рецептора происходит активация фосфолипазы C, каскада IP3 и диацилглицерола, что в конечном итоге определяет состояние Ca^{2+} -зависимых процессов [46]. Известны данные об опосредованном через σ_1 -рецепторы влиянии на дофамин-, серотонин-, холинергические системы [9, 31, 42], продукцию и функционирование факторов роста нервов [57, 58, 66], а также экспрессию генов, в том числе регулирующих апоптоз [60, 68].

С σ_1 -рецептором способны связываться нейростероиды [56], физиологически активные нейропептиды [51], нейролептики (галоперидол) [55], антидепрессанты (имипрамин) [50, 57], бензоморфаны [(+)-пентазоцин] [53], другие соединения [15].

В экспериментальных исследованиях лиганды σ_1 рецепторов проявили ряд фармакологических свойств, среди которых отмечены анксиолитический и нейропротекторные эффекты, схожие с афобазолом [7, 30, 43].

Поскольку σ_1 -рецепторы являются высококонсервативными белками, количество и локализация которых практически не изменяются в онтогенезе, вовлечены в разнообразные механизмы, поддерживающие гомеостаз клетки и ее жизнеспособность, отвечают на многие эндогенные соединения, изменения концентрации которых имеют приспособительный характер, можно полагать, что эти белки представляют эволюционно выработанные образования, осуществляющие функции защиты клетки при негативных воздействиях, и служат своеобразным “ремонтным комплектом” клетки. Если данная гипотеза верна, то область применения афобазола в клинической практике может быть значительно расширена. Экспериментальные подтверждения гипотезы представлены в статьях настоящего выпуска и предыдущих публикациях [5, 52].

Таблица 3. Влияние трехкратной отмывки митохондрий от афобазола на активность MAO-A митохондрий печени

Условия эксперимента	Активность MAO-A, % от исходной активности
Преинкубация с афобазолом (1 мМ, 30 мин)	46 ± 4
Преинкубация с афобазолом (1 мМ, 30 мин) + отмывка	105 ± 6
Уровень значимости (p)	< 0,01

Примечание. Указана активность MAO-A, полученная в результате 3 – 4 независимых экспериментов и выраженная в процентах по отношению к контролю. Данные представлены в виде $M \pm S. E. M.$ Статистический анализ проводили с использованием t-критерия для зависимых выборок.

MT₃-рецепторы. Среди рецепторов мелатонина MT₃ тип наименее изучен и имеет ряд свойств, позволяющих выделить его в отдельный класс. MT₃ рецептор представляет регуляторный участок фермента хинонредуктазы 2 (QR2, NQR2 E. C. 1.10.99.2) и характеризуется быстрой кинетикой процессов ассоциации и диссоциации с лигандами [38]. Аминокислотный состав MT₃ рецептора из ткани почки сирийского хомяка на 95 % совпадает с QR2 человека. Трансфекция гена QR2 человека в клеточную культуру приводила не только к развитию хинонредуктазной активности, но и к возникновению способности к связыванию MCA-NAT (2-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine) — наиболее специфического лиганда MT₃ рецептора, что позволило говорить об идентичности молекул фермента и рецептора [47]. В более поздних экспериментах это предположение было подтверждено на модели нокаутных мышей по гену NQR2 (NQR2-/-), ткани которых оказались неспособны к специфическому связыванию MCA-NAT [39].

Хинонредуктаза 2 и родственный фермент хинонредуктаза 1 (QR1) катализируют процессы детоксикации высокореактивных экзогенных хинонов, предохраняя клетки от окислительного стресса [13]. Тем не менее основная биологическая роль QR2 на сегодняшний день до конца не определена. Экспрессия гена QR2 имеет значительные межвидовые различия, однако наибольшее содержание фермента обнаруживается в печени и почках и в меньших количествах — в головном мозге [48]. Промотор гена QR2 включает копию ARE (*antioxidant response element*) последовательности, отвечающую за индукцию экспрессии в ответ на ряд ксенобиотиков и антиоксидантов [28]. Наличие данной последовательности характерно для многих генов ферментов детоксикации. Каталитические участки QR1 и QR2 имеют высокую степень гомологии и обеспечивают восстановление хинонных субстратов с переносом 1, 2 или 4 электронов [10, 33, 35]. Несмотря на схожесть QR1 и QR2 ферменты используют разные ко-субстраты и субстраты, а также реагируют на различные ингибиторы [10, 65]. В восстановительных реакциях QR1 участвуют NADH и NADPH, тогда как QR2 использует N-ribosyldihydronicotinamide (NRH) и N-methyldihydronicotinamide (NMH) [36, 65, 70]. Известно немного субстратов QR2. К их числу относят менадион (витамин K3), допахиноны и коэнзим Q₀ (убихинон) — единственный известный на сегодняшний день эндогенный субстрат фермента. J. A. Boutin и соавт. [10] не исключают возможность взаимодействия QR2 с убихинонами с изопрениловыми боковыми цепями различной длины (Q1 – Q10). Учитывая способность убихинонов встраиваться в биологические мембраны, в том числе мембраны митохондрий, где они включаются в дыхательную цепь переноса электро-

нов, QR2 может модулировать гомеостаз и энергетический баланс клетки [10]. В этой связи интересно отметить общие клеточные структуры, участвующие в реализации эффектов афобазола как лиганда σ_1 и MT₃ рецепторов. Установлено также, что QR2 играет определенную роль в метаболической активации противоопухолевых препаратов из класса хинонов [11]. Несмотря на невысокое содержание фермента в головном мозге, в последнее время особое внимание уделяется его регуляторным функциям в ЦНС. Например, обсуждается влияние полиморфизма промоторной области гена QR2 в регуляции экспрессии и, как следствие, предрасположенности к болезни Паркинсона [62], а фермент рассматривается в качестве оксидазы токсичных катехоловых хинонов, продуктов окисления дофамина [19]. Фармакологическое значение связывания афобазола с MT₃ типом рецептора должно явиться предметом дальнейших исследований.

MT₁ рецептор на сегодняшний день изучен достаточно хорошо. Известно, что данный тип рецептора мелатонина связан с G-белками. Через MT₁ рецептор мелатонин участвует в регуляции циркадных ритмов. Установлено также, что мелатонин играет важную роль в формировании поведенческих реакций, а лиганды MT₁ рецептора обладают антидепрессивным и анксиолитическим свойствами [17, 32, 63]. Не исключено, что анксиолитическое действие афобазола опосредуется и через данный тип рецептора. Мягкий антидепрессивный эффект афобазола может проявляться также посредством ингибирования активности MAO-A — классической “мишени” для антидепрессантов [18, 69].

Таким образом, рецепторограммы, полученные в результате исследования взаимодействия афобазола с нейрорецепторами, и результаты иммунофлюоресцентного исследования *in vitro* внутриклеточной локализации σ_1 -рецептора в ответ на введение афобазола полностью соответствуют установленным фармакологическим эффектам афобазола, раскрывают первичные механизмы его действия как анксиолитика и нейропротектора и определяют дальнейшие перспективы фармакологического изучения и применения в фармакотерапии.

ВЫВОДЫ

1. Установлено взаимодействие афобазола с σ_1 ($K_i = 5,9 \cdot 10^{-6}$ М), MT₁ ($K_i = 1,6 \cdot 10^{-5}$ М), MT₃ ($K_i = 9,7 \cdot 10^{-7}$ М) рецепторами и регуляторным участком MAO-A ($K_i = 3,6 \cdot 10^{-6}$ М).

2. Афобазол в концентрации 10^{-8} М при 30 и 60 мин инкубации с иммортализованными клетками гиппокампа HT-22 вызывает транслокацию σ_1 -рецептора из эндоплазматического ретикула в область наружной мембраны клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. И. П. Галаева, Т. Л. Гарибова, Т. А. Воронина и др., *Бюл. эк-спер. биол.*, **140**(5), 535 – 537 (2005).
2. Т. А. Зенина, И. В. Гавриш, Д. С. Мелкумян и др., *Бюл. Эк-спер. биол.*, **140**(8), 194 – 196 (2005).
3. В. Ф. Позднев, Л. Н. Аксенова, А. Е. Медведев, *Биохимия*, **65**, 1288 – 1294 (2000).
4. С. Б. Середенин, А. О. Виглинская, Т. Я. Можаяева и др., *Эк-спер. и клин. фармакол.*, **71**(2), 50 – 52 (2008).
5. С. Б. Середенин, Т. А. Воронина, Г. Г. Незнамов и др., *Вестн. РАМН*, **11**, 3 – 9 (1998).
6. М. А. Яркова, *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Москва (1996).
7. С. Т. Ajmo, Jr., D. O. Vernon, L. Collier, et al., *Current neuro-vascular research*, **3**(2), 89 – 98 (2006).
8. E. Aydar, C. P. Palmer, V. A. Klyachko, and M. B. Jackson, *Neuron*, **34**(3), 399 – 410 (2002).
9. J. E. Bermack and G. Debonnel, *Journal of pharmacological sciences*, **97**(3), 317 – 336 (2005).
10. J. A. Boutin, F. Chatelain-Egger, F. Vella, et al., *Chemico-biological interactions*, **151**(3), 213 – 228 (2005).
11. C. M. Celli, N. Tran, R. Knox, and A. K. Jaiswal, *Biochem Pharmacol.*, **72**(3), 366 – 376 (2006).
12. A. M. Cesura, M. Bos, M. D. Galva, et al., *Molecular pharmacology*, **37**(3), 358 – 366 (1990).
13. S. Chen, K. Wu, and R. Knox, *Free radical biology & medicine*, **29**(3 – 4), 276 – 284 (2000).
14. Y. Cheng, W. H. Prusoff, *Biochemical pharmacology*, **22**(23), 3099 – 3108 (1973).
15. T. L. Collier, R. N. Waterhouse, and M. Kassiou, *Current pharmaceutical design*, **13**(1), 51 – 72 (2007).
16. M. Da Prada, R. Kettler, H. H. Keller, et al., *Journal of neural transmission*, **29**, 279 – 292 (1990).
17. M. L. Dubocovich, M. A. Rivera-Bermudez, M. J. Gerdin, and M. I. Masana, *Front Biosci*, **8**, d1093 – 1108 (2003).
18. A. Feldstein, H. Hoagland, M. Rivera Oktem, and H. Freeman, *Int J Neuropsychiatry*, **1**(4), 384 – 387 (1965).
19. Y. Fu, L. Buryanovskyy, and Z. Zhang, *J. Biol. Chem.*, **283**(35), 23829 – 23835 (2008).
20. M. E. Ganapathy, P. D. Prasad, W. Huang, et al., *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **289**(1), 251 – 260 (1999).
21. B. Halliwell, *Journal of neurochemistry*, **97**(6), 1634 – 1658 (2006).
22. M. Hanner, F. F. Moebius, A. Flandorfer, et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**(15), 8072 – 8077 (1996).
23. T. Hayashi and T. Su, *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, **11**(Supplement 1), 116 – 117 (2008).
24. T. Hayashi and T. P. Su, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**(41), 14949 – 14954 (2004).
25. T. Hayashi and T. P. Su, *Life sciences*, **77**(14), 1612 – 1624 (2005).
26. T. Hayashi and T. P. Su, *Cell*, **131**(3), 596 – 610 (2007).
27. J. Licinio, M. L. Wong (eds.), *Biology of Depression. From Novel Insights to Therapeutic Strategies*, WILEY-VCH, Weinheim, (2005).
28. A. K. Jaiswal, *Free radical biology & medicine*, **29**(3 – 4), 254 – 262 (2000).
29. O. Jbilo, H. Vidal, R. Paul, et al., *J. Biol. Chem.*, **272**(43), 27107 – 27115 (1997).
30. C. Katnik, W. R. Guerrero, K. R. Pennypacker, et al., *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **319**(3), 1355 – 1365 (2006).
31. T. Kobayashi, K. Matsuno, M. Murai, and S. Mita, *Neurochemical research*, **22**(9), 1105 – 1109 (1997).
32. C. Kopp, E. Vogel, M. Rettori, et al., *Neuropharmacology*, **39**(10), 1865 – 1871 (2000).
33. J. J. Kwiek, T. A. Haystead, and J. Rudolph, *Biochemistry*, **43**(15), 4538 – 4547 (2004).
34. A. S. Lesage, K. L. De Loore, L. Peeters, and J. E. Leysen, *Synapse* (New York, N. Y.), **20**(2), 156 – 164 (1995).
35. R. Li, M. A. Bianchet, P. Talalay, and L. M. Amzel, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **92**(19), 8846 – 8850 (1995).
36. S. Liao, J. T. Dulaney, and H. G. Williams-Ashman, *J. Biol. Chem.*, **237**, 2981 – 2987 (1962).
37. B. P. Lockhart, P. Soulard, C. Benicourt, et al., *Brain Res*, **675**(1 – 2), 110 – 120 (1995).
38. F. Mailliet, G. Ferry, F. Vella, et al., *Biochem. Pharmacol.*, **71**(1 – 2), 74 – 88 (2005).
39. F. Mailliet, G. Ferry, F. Vella, et al., *FEBS Lett*, **578**(1 – 2), 116 – 120 (2004).
40. W. R. Martin, C. G. Eades, J. A. Thompson, et al., *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **197**(3), 517 – 532 (1976).
41. M. Martina, M. E. Turcotte, S. Halman, and R. Bergeron, *The Journal of physiology*, **578**(Pt 1), 143 – 157 (2007).
42. K. Matsuno, K. Matsunaga, T. Senda, and S. Mita, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **265**(2), 851 – 859 (1993).
43. T. Maurice, V. L. Phan, A. Urani, et al., *Japanese journal of pharmacology*, **81**(2), 125 – 155 (1999).
44. A. E. Medvedev, A. A. Kirek, N. S. Kamyshanskaya, et al., *Biochemical pharmacology*, **47**(2), 303 – 308 (1994).
45. P. J. Mohler, J. Q. Davis, L. H. Davis, et al., *J. Biol. Chem.*, **279**(13), 12980 – 12987 (2004).
46. M. P. Morin-Surun, T. Collin, M. Denavit-Saubie, et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**(14), 8196 – 8199 (1999).
47. O. Nosjean, M. Ferro, F. Coge, et al., *J. Biol. Chem.*, **275**(40), 31311 – 31317 (2000).
48. O. Nosjean, J. P. Nicolas, F. Klupsch, et al., *Biochem. Pharmacol.*, **61**(11), 1369 – 1379 (2001).
49. D. S. Pickering and L. P. Niles, *Eur. J. Pharmacol.*, **175**(1), 71 – 77 (1990).
50. C. Rogers and S. Lemaire, *Canadian journal of physiology and pharmacology*, **70**(11), 1508 – 1514 (1992).
51. F. J. Roman, B. Martin, and J. L. Junien, *European journal of pharmacology*, **242**(3), 305 – 307 (1993).
52. S. B. Seredenin, *Psychopharmacology & Biological Narcology*, **1 – 2**, 494 – 509 (2003).
53. G. F. Steinfels, G. P. Alberici, S. W. Tam, and L. Cook, *Neuropsychopharmacology*, **1**(4), 321 – 327 (1988).
54. T. P. Su, *European journal of pharmacology*, **75**(1), 81 – 82 (1981).
55. T. P. Su, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **223**(2), 284 – 290 (1982).
56. T. P. Su, E. D. London, and J. H. Jaffe, *Science* (New York, N. Y.), **240**(4849), 219 – 221 (1988).
57. M. Takebayashi, T. Hayashi, and T. P. Su, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **303**(3), 1227 – 1237 (2002).
58. M. Takebayashi, T. Hayashi, and T. P. Su, *Synapse* (New York, N. Y.), **53**(2), 90 – 103 (2004).
59. S. W. Tam, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **80**(21), 6703 – 6707 (1983).
60. K. T. Tchandre and T. Yorio, *Investigative ophthalmology & visual science*, **49**(6), 2577 – 2588 (2008).

61. K. Vagnerova, P. D. Hurn, A. Bhardwaj, and J. R. Kirsch, *Anesthesia and analgesia*, **103**(2), 430 – 434 (2006).
62. W. Wang, W. D. Le, T. Pan, et al., *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **63**(2), 127 – 134 (2008).
63. Z. M. Weil, A. K. Hotchkiss, M. L. Gatién, et al., *Brain Res Bull.*, **68**(6), 425 – 429 (2006).
64. P. A. Witt-Enderby and M. L. Dubocovich, *Molecular pharmacology*, **50**(1), 166 – 174 (1996).
65. K. Wu, R. Knox, X. Z. Sun, et al., *Archives of biochemistry and biophysics*, **347**(2), 221 – 228 (1997).
66. Y. Yagasaki, T. Numakawa, E. Kumamaru, et al., *J. Biol. Chem.*, **281**(18), 12941 – 12949 (2006).
67. H. Yamamoto, T. Yamamoto, N. Sagi, et al., *J. Neurosci.*, **15**(1 Pt 2), 731 – 736 (1995).
68. S. Yang, A. Bhardwaj, J. Cheng, et al., *Anesthesia and analgesia*, **104**(5), 1179 – 1184, tables of contents (2007).
69. M. B. Youdim and J. P. Finberg, *Mod Probl Pharmacopsychiatry*, **19**, 63 – 74 (1983).
70. Q. Zhao, X. L. Yang, W. D. Holtzclaw, and P. Talalay, *Proc. Natl Acad Sci USA*, **94**(5), 1669 – 1674 (1997).

Поступила 25.09.08

NEURORECEPTOR MECHANISMS INVOLVED IN THE ACTION OF AFOBAZOLE

S. B. Seredenin and M. V. Voronin

Laboratory of Pharmacogenetics, Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiskaya 8, Moscow, 125315, Russia

The interaction of afobazole (5-ethoxy-2-[2-(morpholino)-ethylthio]benzimidazole dihydrochloride) and its main metabolite M-11 (2-[2-(3-oxomorpholine-4-yl)-ethylthio]-5-ethoxy benzimidazole hydrochloride) with neuroreceptors was studied using the method of radioligand analysis. The binding of afobazole with $\alpha 1$ ($K_i = 5.9 \cdot 10^{-6}$ M), MT1 ($K_i = 1.6 \cdot 10^{-5}$ M), and MT3 ($K_i = 9.7 \cdot 10^{-7}$ M) receptors, as well as with a regulatory site of MAO-A ($K_i = 3.6 \cdot 10^{-6}$ M) was revealed. The binding of M-11 with MT3 receptors ($K_i = 3.9 \cdot 10^{-7}$ M) was demonstrated. The translocation of $\alpha 1$ receptor from endoplasmic reticulum to the external membrane was revealed by the confocal microscopy technique on the immortalized hippocampal HT-22 cells under the condition of 30- and 60-min-long afobazole (10^{-8} M) application. Afobazole was shown to inhibit MAO-A reversibly. These properties of afobazole are consistent with our previous findings of the anxiolytic and neuroprotective effects of this drug.

Key words: Afobazole, sigma 1 receptors, melatonin receptors, MAO-A, radioligand binding, immunofluorescence