

Е. В. Абрамова, М. В. Воронин, С. Б. Середенин

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АФОБАЗОЛА С СИГМА-1 РЕЦЕПТОРАМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ**

ФГБНУ "НИИ фармакологии им. В. В. Закусова", Россия, 125315, Москва, ул. Балтийская 8; e-mail: ryaskinv@mail.ru

Методом радиолигандного анализа изучено взаимодействие афобазола с сигма-1 рецепторами (Sigma1) головного мозга инбредных C57Bl/6, BALB/c и беспородных CD-1 мышей. Установлена идентичность сайтов связывания афобазола и прототипных агонистов Sigma1 (+)-пентазоцина и PRE-084. В зависимости от структуры прототипного лиганда и условий инкубации *in vitro* специфическое связывание афобазола с Sigma1 на гомогенатах головного мозга инбредных мышей характеризуется различными моделями рецепторного взаимодействия. При конкурентном вытеснении [G-<sup>3</sup>H]PRE-084 аффинность Sigma1 к афобазолу у мышей BALB/c оказалась значимо выше, чем у C57Bl/6 и CD-1.

**Ключевые слова:** афобазол; сигма-1 рецептор; (+)-пентазоцин; PRE-084; мыши.

В предыдущих исследованиях *in vitro* на линии Т-лимфоцитов человека Jurkat анксиолитик афобазол (5-этоксис-2-[2-(морфолино)этилтио]бензимидазола дигидрохлорид, I) проявил лигандные свойства к сигма-1 рецепторам ( $\sigma_1$  рецептор, Sigma1) ( $K_i = 5,9 \cdot 10^{-6}$  М,  $IC_{50} = 7,1 \cdot 10^{-6}$  М) [1]. Sigma1 представляет собой интегрированный в мембрану белок с преимущественно внутриклеточной локализацией, состоящий из 223 аминокислотных остатков с молекулярной массой 25 кДа (<http://www.uniprot.org/uniprot/O55242>). Трансмембранные и цитозольные домены образуют сайты связывания, лигандная активация которых обеспечивает регуляцию рецептора [2]. В эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) посредством белок-белкового взаимодействия Sigma1 стабилизируют рецепторы для инозитол-1,4,5-трифосфата третьего типа (IP3R3), поддерживая таким образом необходимое содержание ионов  $Ca^{2+}$  в митохондриях, и регулируют активность основного шаперона ЭПР BiP (binding immunoglobulin protein, heat shock 70 kDa protein 5, 78 kDa glucose-regulated protein). При лигандной активации Sigma1 в составе липидных рафтов способен к перемещению в область наружной мембраны, где участвует в её ремоделировании, и взаимодействует с ионными каналами, рецепторами и ферментами [3, 4].

Селективные и неселективные лиганды Sigma1 с агонистической и антагонистической активностью принадлежат к разным химическим группам. К экзогенным селективным лигандам относятся соединения: 1-(3,4-диметоксифенетил)-4-(3-фенилпропил)пиперазина дигидрохлорид (SA4503), 2-(4-морфолинэтил)-1-фенилциклогексанкарбоксилат гидрохлорид (PRE-084, II), (+)-пентазоцин (III), *N*-(2-(3,4-дихлорфенил)этил)-*N*-метил-2-(диметиламино)этиламин (BD-1047) [5]. К неселективным относят галоперидол, (+)-3-(3-гидроксифенил)-*N*-(1-пропил)пиперидин (3-PPP) и 1,3-ди-*o*-толилгуанидин (DTG) [5]. Предполагается, что стероиды прогестерон и дегидроэпиандростерон (IV) являются соответственно эндогенным антагонистом и агонистом Sigma1 [6]. Ранее установленное на культурах Т-лимфоцитов человека средство I к Sigma1 близко по значению к аффинности эндогенного агониста IV ( $K_i \approx 3 \cdot 10^{-6}$  М) [7]. В продолжение исследований по изучению лигандного взаимодействия I и Sigma1 в настоящей работе уста-

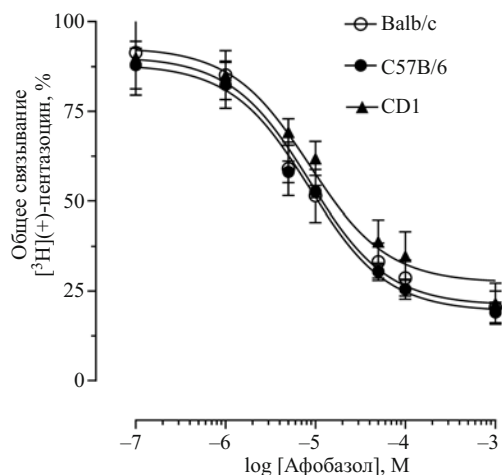
новлены параметры рецепторного связывания I при использовании различных прототипных лигандов в тканях головного мозга интактных инбредных (C57Bl/6, BALB/c) и аутбредных (CD-1) мышей.

*Экспериментальная химическая часть*

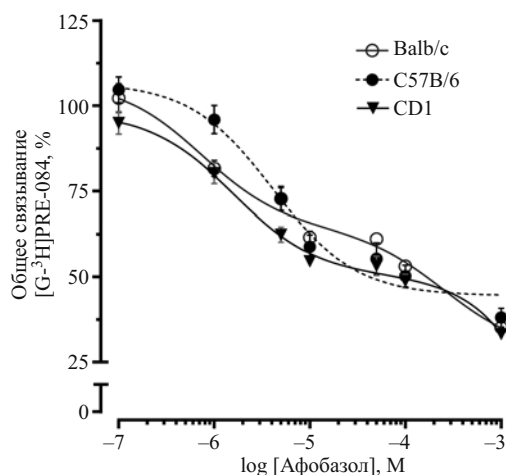
В эксперименте использовали селективные прототипные лиганды Sigma1 [<sup>3</sup>H]III ([Ring-1,3-<sup>3</sup>H]-(+)-Pentazocine, PerkinElmer, 29,0 Ci/mmol) в конечной концентрации 1 нМ и равномерно меченое соединение [G-<sup>3</sup>H]II ([G-<sup>3</sup>H]PRE-084) (НИИ молекулярной генетики РАН, 110 Ci/mmol) в концентрации 0,8 нМ. В качестве холодного лиганда применяли I (ФГБНУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова) в диапазоне конечных концентраций  $10^{-3} - 10^{-7}$  М.

*Экспериментальная биологическая часть*

В исследовании использовали мышей-самцов инбредных линий C57Bl/6 ( $n = 9$ ) и BALB/c ( $n = 9$ ), а также аутбредной линии CD-1 ( $n = 9$ ) массой 20 – 25 г (НПП Питомник лабораторных животных ФИБХ). Животные были подвергнуты эвтаназии методом цервикальной дислокации и декапитации. Головной мозг извлекали, отделяя мост и мозжечок. Гомогенизирование образцов и получение P1 фракции проводили согласно методике [8]. Область переднего, промежуточного и среднего мозга гомогенизировали в 7,5 мл 10 мМ Tris-HCl буфера в присутствии 0,32 М раствора сахарозы (pH = 7,4) с использованием диспергатора Utra-Turrax T25 (Janke&Kunkel, IKA-Labortechnik) при 24000 оборотах/мин. P2 фракции гомогенатов получены посредством дифференциального центрифугирования в ультрацентрифуге Optima L-70K (Beckman Coulter), а именно в результате 2 центрифугирования при 1000 g в течение 10 мин и последующей открутки полученного супернатанта при 10000 g в течение 20 мин. Радиолигандный анализ проводили в условиях инкубации I и [<sup>3</sup>H]III (1 нМ) с мембранной фракцией (5 – 6,5 мг белка/мл суспензии) в 500 мкл 50 мМ Tris-HCl буфера (pH = 7,4) в течение 120 мин при температуре 37 °С. Инкубацию I и [G-<sup>3</sup>H]II (0,8 нМ) с мембранной фракцией проводили в присутствии 500 мкл 50 мМ Tris-HCl буфера (pH = 7,4) при температуре 4 °С в тече-



**Рис. 1.** *In vitro* конкурентное вытеснение препаратом I [<sup>3</sup>H]III в P2 фракции гомогенатов головного мозга мышей линий C57Bl/6, Balb/c, CD-1. *N* = 3. Здесь и на рис. 2: *N* — количество животных на одну экспериментальную точку; *M* — концентрация афобазола, моль/л. Данные представлены в виде *m* ± S.E.M.



**Рис. 2.** *In vitro* конкурентное вытеснение препаратом I [G-<sup>3</sup>H]II в P2 фракции гомогенатов головного мозга мышей линий C57Bl/6, Balb/c, CD-1. *N* = 6.

ние 15 мин. Связывание останавливали быстрой фильтрацией через стекловолоконные фильтры GF/B (Whatman), предварительно обработанные 0,05 % полиэтиленгликолем. Объем фильтрационного Tris-HCl буфера составил 6 мл (*T* = 4 °C, pH = 8,0). Радиоактивность образцов измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике Tri Carb 2900TR (PerkinElmer) с использованием сцинтиллятора Брея. Специфическое рецепторное связывание определялось как разность общего и неспецифического. Неспецифическое связывание не превышало 35 %. Для математического обчета и статистического анализа конкурентного вытеснения прототипных лигандов с I применяли программный продукт GraphPad Prism version 5.02 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com). Предпочтительная модель рецепторного связывания определялась с использованием *F*-критерия (*F*-test) (<http://www.graphpad.com/guides/prism/5/user-guide/prism5help.html?howthetestworks.htm>). Расчет концентрации I, ингибирующей связывание [<sup>3</sup>H]III на 50 % (IC<sub>50</sub>), проводили согласно уравнению криволинейной регрессии с одним сайтом связывания (One site-Fit logIC<sub>50</sub>). При конкурентном вытеснении [G-<sup>3</sup>H]II параметры IC<sub>50Hi</sub> (IC<sub>50</sub> в области низких концентраций лиганда) и IC<sub>50Lo</sub> (IC<sub>50</sub> в области высоких концентраций лиганда) I рассчитывали согласно уравнению криволинейной регрессии с 2 сайтами связывания (Two sites-Fit logIC<sub>50</sub>).

### Результаты и их обсуждение

Изучение рецепторного взаимодействия с использованием различных прототипных селективных агонистов Sigmar1 позволило рассмотреть взаимодействие I с Sigmar1 в разных температурных условиях и временных диапазонах. В условиях конкурентного вытеснения [<sup>3</sup>H]III равновесная концентрация лиганд-рецепторных комплексов достигалась длительной инкубацией (120 мин) при температуре 37 °C. В результате рассмотрения в качестве нулевой гипотезы модели с 1 сайтом связывания установлено, что кривые конкурентного вы-

теснения [<sup>3</sup>H]III для мышей линий C57Bl/6, BALB/c и CD-1 (рис. 1) описываются специфичным для данной модели уравнением криволинейной регрессии (*p* = 0,59; *p* = 0,82; *p* = 0,76 *F*-test). Рассчитанные значения IC<sub>50</sub> I при конкурентном вытеснении [<sup>3</sup>H]III составили 7,745 · 10<sup>-6</sup>, 6,368 · 10<sup>-6</sup> и 1,370 · 10<sup>-5</sup> М для мышей линий C57Bl/6, BALB/c и CD-1 соответственно. При статистическом анализе величин IC<sub>50</sub> достоверных отличий не выявлено (*p* = 0,27 *F*-test), что отражает отсутствие межлинейных различий в аффинности I к Sigmar1 рецепторам в данных экспериментальных условиях.

В следующей серии экспериментов в качестве меченого лиганда использовали [G-<sup>3</sup>H]II. В условиях конкурентного вытеснения препаратом I [G-<sup>3</sup>H]II равновесная концентрация лиганд-рецепторных комплексов относительно быстро достигается при температуре 4 °C, что позволяет ограничить время инкубации 15 мин. При конкурентном вытеснении I [G-<sup>3</sup>H]II (рис. 2) из мест связывания для линии C57Bl/6 предпочтительной оказалась нулевая гипотеза, соответствующая модели с 1 сайтом связывания (*p* = 0,0841 *F*-test). Однако в тех же условиях для линий BALB/c и CD-1 кривые конкурентного вытеснения подчиняются уравнению криволинейной регрессии с 2 сайтами связывания (*p* < 0,0001 *F*-test).

Величина IC<sub>50</sub>, рассчитанная для линии C57Bl/6 с использованием уравнения криволинейной регрессии с 1 сайтом связывания (4,109 · 10<sup>-6</sup> М), оказалась численно близкой к IC<sub>50Hi</sub> для модели с 2 сайтами связывания (3,014 · 10<sup>-6</sup> М), что позволило использовать последнее значение при межлинейном статистическом анализе. IC<sub>50Hi</sub> для мышей линий BALB/c и CD-1 составили 7,367 · 10<sup>-7</sup> и 1,583 · 10<sup>-6</sup> М соответственно. Значения IC<sub>50Lo</sub> находились в области миллимолярных концентраций. В условиях применения к экспериментальным данным модели с 2 сайтами связывания установлено, что Sigmar1 головного мозга BALB/c (IC<sub>50Hi</sub> = 7,367 · 10<sup>-7</sup> М) характеризуется более высоким сродством к I (*p* = 0,0327 *F*-test) в сравнении с линией C57Bl/6 (IC<sub>50Hi</sub> = 3,014 · 10<sup>-6</sup> М). Статистически значимых различий в аффинности Sigmar1 к I линии CD-1 по сравнению с BALB/c (*p* = 0,1673 *F*-test) и C57Bl/6 (*p* = 0,1438 *F*-test) не выявлено.

В выполненном исследовании на гомогенатах головного мозга мышей C57Bl/6, BALB/c и CD-1 показано, что для разных линий и избранных экспериментальных условий *in vitro* конкурентное вытеснение препаратом I прототипных агонистов Sigmar1 характеризуется неодинаковыми моделями связывания и параметрами IC<sub>50</sub>. Полученные результаты могут быть объяснены как отличиями структуры меченых лигандов, так и различным функциональным состоянием Sigmar1 линейных мышей. III и II обладают различной гидрофильностью, для количественного анализа их лиганд-рецепторного взаимодействия оптимальные условия неодинаковы. Данная особенность дала возможность проанализировать конкурентное вытеснение препаратом I меченых прототипных агонистов Sigmar1, варьируя длительность инкубации и температуру. В нашей работе установлено, что при вытеснении препаратом I липофильного лиганда [<sup>3</sup>H]III в условиях длительной инкубации (120 мин) при температуре 37 °С характер рецепторного связывания и значения IC<sub>50</sub> у исследуемых животных статистически не отличались. В то же время анализ конкуренции гидрофильных лигандов [G-<sup>3</sup>H]II и I при температуре таяния льда (4 °С) в условиях короткой инкубации (15 мин) позволил выявить не только межлинейные различия в применимости моделей рецепторного связывания, но и установить отличия в аффинности I к Sigmar1. Интересно сопоставить полученные данные с результатами исследования [9], где установлено, что Sigmar1 способен специфически связывать III только в олигомерном состоянии, которое стабилизируется в присутствии лигандов. В отсутствие лигандов при длительной инкубации *in vitro* (18 ч, 37 °С) 40 % рецептора переходит в мономерное состояние, что сопровождается снижением связывающей способности. Авторы отмечают, что переход рецептора в мономерное состояние замедляется при температуре 4 °С, что возможно связано с переходом мембраны в гель-состояние и стабилизацией рецепторного комплекса. Не исключено, что при конкурентном вытеснении препаратом I соединения II подобный механизм регуляции рецептора может отчасти определять фиксируемый в условиях короткой инкубации при температуре 4 °С различный характер лиганд-рецепторного взаимодействия у инбредных животных. Можно предположить, что данные различия нивелируются в условиях длительной инкубации при 37 °С.

## INTERACTION OF AFOBAZOLE WITH SIGMA-1 RECEPTORS IN MICE BRAIN

E. V. Abramova\*, M. V. Voronin, and S. B. Seredenin

Zakusov State Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 125315 Russia;

\* e-mail: ryaskinv@mail.ru

Afobazole interaction with sigma-1 receptors (Sigmar1) in brain of inbred C57Bl/6, BALB/c and outbred CD-1 mice was studied by radioligand binding assay. The identity of binding sites of afobazole and sigma-1 receptor prototype agonists (+)-pentazocine and PRE-084 is established. Depending on prototype ligand chemical structure and *in vitro* incubation conditions, afobazole specific binding to Sigmar1 in inbred mice brain homogenate is characterized by different receptor binding models. Under conditions of [G-<sup>3</sup>H]PRE-084 competitive binding assay, afobazole affinity to Sigmar1 in BALB/c was notably higher than in C57Bl/6 and CD-1 mice.

**Keywords:** afobazole; sigma-1 receptor; (+)-pentazocine; PRE-084; mice.

Необходимо отметить, что функциональная активность рецептора может регулироваться не только лигандами, но и другими низкомолекулярными соединениями. Так, в исследовании [10] при конкурентном вытеснении меченого III *in vitro* дифференцирование моделей рецепторного связывания наблюдалось в зависимости от присутствия в инкубационной среде ГТФ. Принимая во внимание ранее установленные существенные межлинейные различия мышей C57Bl/6, BALB/c и CD-1 в реакциях на хэндлинг [11], нельзя исключить, что в процессе манипуляций с линейными животными возникают неоднородные воздействия на Sigmar1 со стороны эндогенных модуляторов.

Полученные экспериментальные данные позволяют сделать заключение об идентичности сайтов связывания I и прототипных агонистов Sigmar1 III и II. В условиях хэндлинга конкурентное взаимодействие I с агонистами Sigmar1 характеризуется различными параметрами связывания у животных с разными фенотипами стрессового ответа в зависимости от длительности и температуры инкубации *in vitro*.

Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-01014.

## ЛИТЕРАТУРА

1. E. V. Ryaskina, M. V. Voronin and S. B. Seredenin, *Pharm. Chem. J.*, **46**(6), 334 – 336 (2012); E. В. Ряскина, М. В. Воронин, С. В. Середенин, *Хим.-фарм. журн.*, **46**(6), 12 – 13 (2012).
2. A. E. Ruoho, U. B. Chu, S. Ramachandran, et al., *Cur. Pharm. Des.*, **18**(7), 920 – 929 (2012).
3. T. Hayashi and T. Su, *Cur. Neuropharmacol.*, **3**(4), 267 – 280 (2005).
4. T. Su, T. Hayashi, T. Maurice, et al., *Trends Pharmacol. Sci.*, **31**(12), 557 – 566 (2010).
5. G. Skuza, *Cur. Pharm. Des.*, **18**(7), 863 – 874 (2012).
6. E. J. Cobos, J. M. Entrena, F. R. Nieto, et al., *Cur. Neuropharmacol.*, **6**(4), 344 – 366 (2008).
7. T. Maurice, F. J. Roman and A. Privat, *J. Neurosci. Res.*, **46**(6), 734 – 743 (1996).
8. N. A. Colabufo, F. Berardi, M. Contino, et al., *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **368**(2), 106 – 112 (2003).
9. K. A. Gromek, F. P. Suchy, H. R. Meddaugh, et al., *J. Biol. Chem.*, **289**(29), 20333 – 44 (2014).
10. J. M. Brimson, C. A. Brown and S. T. Safrany, *Br. J. Pharmacol.*, **164**(2b), 772 – 780 (2011).
11. J. L. Hurst and R. S. West, *Nat. Methods*, **7**(10), 825 – 826 (2010).

Поступила 29.09.14