

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

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 2-МЕРКАПТОБЕНЗИМИДАЗОЛА С σ_1 РЕЦЕПТОРАМИ

ФГБУ "НИИ фармакологии им. В. В. Закусова" РАМН, Москва, Россия

В экспериментах *in vitro* на клеточной линии Т-лимфоцитов человека методом радиолигандного анализа изучено взаимодействие афобазола и его основного метаболита М-11 (2-[2-(3-оксоморфолин-4-ил)этилтио]-5-этоксibenзимидазол гидрохлорид) с сигма-1 (σ_1) рецепторами. Афобазол проявил лигандные свойства к σ_1 рецепторам с $IC_{50} = 7,1 \cdot 10^{-6}$ М. IC_{50} для М-11 составило $9,6 \cdot 10^{-4}$ М. В экспериментах *in vitro* на гомогенатах головного мозга мышей CD-1 установлено взаимодействие афобазола с σ_1 рецепторами ($IC_{50} = 1,37 \cdot 10^{-5}$ М). М-11 не проявил сродства к σ_1 рецепторам ($IC_{50} > 5 \cdot 10^{-4}$ М). Результаты радиолигандного анализа, полученные в экспериментах на модели беспородных мышей CD-1, согласуются с данными экспериментов на клеточной линии Т-лимфоцитов человека и позволяют сделать заключение об отсутствии вклада σ_1 рецепторов в формирование эффектов соединения М-11.

Ключевые слова: афобазол, метаболит афобазола, σ_1 рецептор, радиолигандное связывание

Афобазол, 5-этокси-2-[2-(морфолино)этилтио]бензимидазола дигидрохлорид, внедрен в клиническую практику в качестве анксиолитика в 2005 г. [1]. На различных экспериментальных моделях установлена нейропротекторная активность афобазола [2–4]. В 2010 г. под товарным знаком "Нейрофазол" соединение в жидкой лекарственной форме зарегистрировано в качестве нейропротекторного средства (Рег. № ЛСР-002102/10). В фармакокинетических экспериментах выделен основной метаболит афобазола — соединение М-11 (2-[2-(3-оксоморфолин-4-ил)этилтио]-5-этоксibenзимидазола гидрохлорид) [5], изучение фармакологического действия которого представляет интерес. Поэтому целесообразно провести сравнительное исследование взаимодействий этих соединений с рецепторами. Исходя из гомологии молекулярной структуры афобазола и М-11, современной модели фармакофора σ_1 рецептора [6], целью нашей работы стало изучение взаимодействия афобазола и его основного метаболита с σ_1 рецепторами на различных моделях *in vitro*.

Экспериментальная химическая часть

В качестве меченого лиганда σ_1 рецепторов использовали [^3H](+)-пентазоцин ((+)-Pentazocine, [Ring-1,3- ^3H], 1 mCi (37 MBq), PerkinElmer).

Афобазол (5-этокси-2-[2-(морфолино)этилтио]бензимидазола дигидрохлорид) и М-11 (2-[2-(3-оксоморфолин-4-ил)этилтио]-5-этоксibenзимидазола гидрохлорид) синтезированы в НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН. Выделение, очистку, детектирование, элементный анализ соединений проводили согласно стандартным методикам [7, 8]. Диапазон конечных концентраций афобазола и М-11 составил $10^{-3} - 10^{-9}$ М в экспериментах на клеточной линии Т-лимфоцитов человека Jurkat и $10^{-3} - 10^{-7}$ М в экспериментах на беспородных мышах линии CD-1.

Экспериментальная биологическая часть

Взаимодействие афобазола и М-11 с σ_1 рецепторами *in vitro* на клеточной линии Т-лимфоцитов человека Jurkat изучали в 2 независимых экспериментах согласно протоколу компании Сегер (Франция) [9]. В качестве меченого лиганда использовали [^3H](+)-пентазоцин в конечной концентрации 8 нМ. Время инкубации меченого и неме-

ченого лигандов с клеточной суспензией составляло 120 мин при температуре 22 °С.

Взаимодействие афобазола и М-11 с σ_1 рецепторами *in vitro* на беспородных мышах CD-1 (НПП Питомник лабораторных животных ФИБХ) изучали на Р2 фракции гомогенатов головного мозга в 3 независимых экспериментах согласно Colabufo, et al. с изменениями [10]. [^3H](+)-пентазоцин использовали в конечной концентрации 1 нМ. Диапазон концентраций для афобазола и М-11 составил $10^{-3} - 10^{-7}$ М. Инкубацию Р2 фракции с [^3H](+)-пентазоцином, афобазолом и М-11 проводили в 500 мкл Tris-HCl буфера (pH = 7,4, 50 mM) при температуре 37 °С в течение 120 мин. Радиолигандное связывание останавливали путем добавления 10 мл 50 mM Tris-HCl буфера (T = 4 °С, pH = 8,0) и последующей быстрой фильтрацией через стекловолоконные фильтры GF/B (Whatman), предварительно обработанные 0,05 % полиэтиленимином. Радиоактивность каждой пробы измеряли на жидкостном сцинтилляционном счётчике Tri-Carb 2900TR (PerkinElmer). В каждом эксперименте специфическое связывание рассчитывали как среднее 3 экспериментальных значений.

Расчет IC_{50} в экспериментах *in vitro* на клеточной линии Т-лимфоцитов человека Jurkat и на беспородных мышах CD-1 проводили по уравнению 1 и 2 соответственно с использованием программного продукта GraphPad Prism version 5.02 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

$$Y = D + [(A - D)/(1 + (C/IC_{50})^{nH})], \quad (1)$$

где Y — специфическое связывание, A — максимальное значение специфического связывания, D — минимальное значение специфического связывания, C — концентрация афобазола, nH — коэффициент Хилла.

$$Y = D + \frac{A - D}{1 + 10^{(C - \text{Log}IC_{50})}}, \quad (2)$$

где Y — специфическое связывание, A — максимальное значение специфического связывания, D — минимальное значение специфического связывания, C — концентрация афобазола.

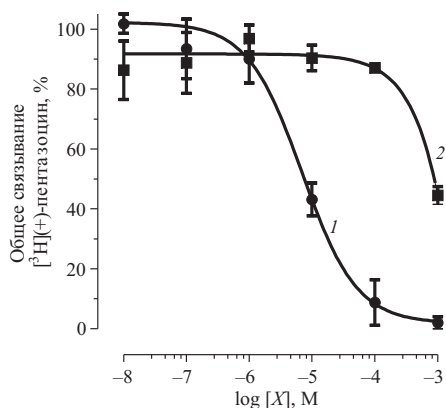


Рис. 1. Конкурентное вытеснение [^3H](+)-пентазоцина афобазолом (1) и М-11 (2) в экспериментах *in vitro* на клеточной линии Т-лимфоцитов человека Jurkat. $\log[X]$ — логарифм концентраций (моль/л) афобазола и М-11.

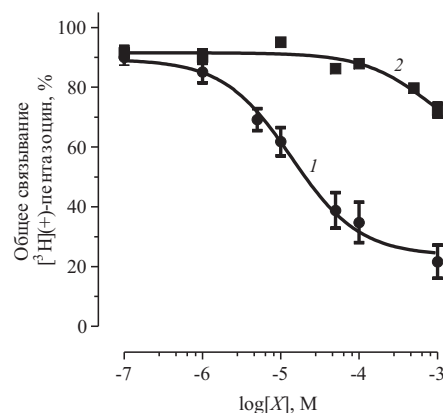


Рис. 2. Конкурентное вытеснение [^3H](+)-пентазоцина афобазолом (1) и М-11 (2) в экспериментах *in vitro* на P2 фракции гомогенатов головного мозга мышей CD1. $\log[X]$ — логарифм концентраций (моль/л) афобазола и М-11.

Результаты и их обсуждение

В результате анализа связывания афобазола и М-11 с культурой Т-лимфоцитов человека были получены кривые конкурентного вытеснения (рис. 1) и рассчитан параметр IC_{50} . В экспериментах афобазол проявил лигандные свойства к σ_1 рецепторам в микромолярном диапазоне ($IC_{50} = 7,1 \cdot 10^{-6}$ М). В тех же экспериментальных условиях значение $IC_{50} = 9,6 \cdot 10^{-4}$ М для М-11 позволяет сделать заключение об отсутствии фармакологически значимого сродства основного метаболита к σ_1 рецепторам. Полученные экспериментальные данные явились основой для дальнейшего изучения рецепторного механизма действия афобазола и М-11 на моделях лабораторных животных.

В серии экспериментов *in vitro* на гомогенатах головного мозга мышей CD1 кривые вытеснения (рис. 2) соответствовали IC_{50} , близким по значению к полученным в экспериментах *in vitro* на культурах Т-лимфоцитов человека, а именно $1,37 \cdot 10^{-5}$ М для афобазола и $> 5 \cdot 10^{-4}$ М для М-11. Результаты экспериментов на модели беспородных мышей CD-1 подтверждают наличие у афобазола лигандных свойств к σ_1 рецепторам в микромолярном диапазоне концентраций и отсутствие сродства к данному типу рецепторов у основного метаболита афобазола М-11.

Принимая во внимание значимость σ_1 рецепторов в механизмах обеспечения активного функционального состояния клеточной мембраны и белковых комплексов, в поддержании энергетического и ионного баланса нейрона [11–13], установленный характер взаимодействия изученных соединений с σ_1 рецепторами позволяет заключить, что различия в фармакологических эффектах афобазола и М-11 могут быть обусловлены недостаточ-

ной аффинностью М-11 к σ_1 рецепторам. Полученные данные определяют планирование последующих фармакологических исследований по крайней мере в 2 аспектах. Во-первых, сравнение фармакологических спектров афобазола и М-11 поможет выяснить σ_1 -зависимый вклад в действие афобазола. Во-вторых, выявление фармакологических свойств М-11 позволит сформировать рабочую гипотезу о значении для эффектов соединения взаимодействия с другими биомолекулами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Г. Г. Незнамов, С. А. Сюняков, Д. В. Чумаков, и др., *Психиатрия и психофармакотер.*, **4**(8), 8–13 (2006).
2. И. П. Галаева, Т. Л. Гарибова, Т. А. Воронина и др., *Бюл. эксперим. биол. мед.*, **140**(11), 545–548 (2005).
3. Т. А. Антипова, Д. С. Сапожникова, Л. Ю. Бахтина и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **72**(1), 12–14 (2009).
4. J. Cuevas, A. Behensky, W. Deng, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **339**(1), 152–60 (2011).
5. А. О. Виглинская, Г. Б. Кольванов, А. А. Литвин и др., *Бюл. эксперим. биол. мед.*, **143**(5), 528–530 (2007).
6. V. Wunsch, *Cur. Pharm. Des.*, **18**(7), 930–937 (2012).
7. Т. Я. Можяева, М. А. Яркова, В. П. Лезина и др., *Хим.-фарм. журн.*, **45**(3), 19–22 (2011).
8. Патент РФ 2061686; *Бюл. изобрет.*, **16**, (1996).
9. M. E. Ganapathy, P. D. Prasad, W. Huang, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **289**(1), 251–60 (1999).
10. N. A. Colabufo, F. Berardi, M. Contino, et al., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **368**(2), 106–112 (2003).
11. T. Hayashi and T. Su, *Cur. Neuropharmacol.*, **3**(4), 267–280 (2005).
12. S. Y. Tsai, T. Hayashi, T. Mori, et al., *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.*, **9**(3), 184–189 (2009).
13. S. D. Banister and M. Kassiou, *Cur. Pharm. Des.*, **18**(7), 884–901 (2012).

Поступила 28.03.12

INTERACTION OF 2-MERCAPTOBENZIMIDAZOLE DERIVATIVES WITH SIGMA-1 RECEPTORS

E. V. Ryaskina, M. V. Voronin, and S. B. Seredenin

Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 1253156 Russia

The interaction of afobazole and its main metabolite M-11 (2-[2-(3-oxomorpholine-4-yl)-ethylthio]-5-ethoxy benzimidazole hydrochloride) with sigma-1 (σ_1) receptors has been studied *in vitro* in binding experiments on human T-cell lymphoblast-like cell line. Afobazole exhibited ligand properties towards σ_1 receptors with $IC_{50} = 7.1 \times 10^{-6}$ M. For M-11, the corresponding value was $IC_{50} = 9.6 \times 10^{-4}$ M. Experiments *in vitro* on P2 fraction obtained from brain homogenate of male CD-1 mice showed that afobazole interacts with σ_1 receptors ($IC_{50} = 1.37 \times 10^{-5}$ M), while M-11 did not show affinity towards σ_1 receptors ($IC_{50} = 5 \times 10^{-4}$ M). The radioligand analysis results on mongrel CD-1 males confirmed the results obtained on human T-cell lymphoblast-like cell line, thus leading to a conclusion that σ_1 receptors do not contribute to the pharmacological effects of M-11.

Key words: afobazole, afobazole metabolite, sigma-1 receptor, radioligand binding