

УДК 577.29:615.214.22

ВЛИЯНИЕ ФАБОМОТИЗОЛА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС MR ПРИ СТРЕССОВОМ ВОЗДЕЙСТВИИ В ТЕСТЕ “ОТКРЫТОЕ ПОЛЕ”

Ю. В. Вахитова^{1,*}, У. Ш. Кузьмина², М. В. Воронин¹, Л. Ф. Зайнуллина¹,
академик РАН С. Б. Середенин¹

Поступило 16.04.2019 г.

Селективный анксиолитик фабомотизол (Афобазол[®]) обладает сродством к рецепторному сайту шаперона sigma-1, регуляторным сайтам хинон редуктазы 2 (NQO2) и MAO-A, мелатониновому рецептору 1 типа (MT₁ рецептор). Проведён анализ влияния фабомотизола на профиль экспрессии генов в мозге крыс линии MR (Maudsley Reactive) при моделировании эмоционально-стрессового воздействия в тесте “открытое поле”. Выявлено изменение экспрессии 14 генов, результаты функциональной аннотации которых показывают, что механизмы действия фабомотизола могут быть связаны с процессами регуляции трансляции белков (*Rpl5*, *Rpl15*, *Ncl*, *Ybx1*), синаптических функций (*Cplx2*, *Dlg4*, *Syngap1*, *Add1*, *Rab8b*, *Klc1*, *Chn1*) и клеточного метаболизма (*Akr1d1*, *Bcat1*, *Pkm*).

Ключевые слова: анксиолитики, фабомотизол, Sigma1 рецептор, экспрессия генов, эмоционально-стрессовые реакции.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524883329-332>

Анксиолитик фабомотизол (Афобазол[®]; 5-этокси-2-[2-(морфолино)-этилтио] бензимидазола дигидрохлорид) разработан и фармакологически изучен в ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В.В. Закусова” [1, 2]. В тесте “открытое поле” (ОП) препарат оказывает селективное анксиолитическое действие на инбредных животных с пассивно-оборонительным поведением, не вызывая седации у животных с активным фенотипом реакции на эмоциональный стресс [2]. В экспериментах *in vitro* установлено, что фабомотизол обладает сродством к рецепторному сайту шаперона sigma-1 (Sigma1R, константа ингибирования $K_i = 5,9 \cdot 10^{-6}$ М), регуляторным сайтам хинон редуктазы 2 (NQO2, $K_i = 9,7 \cdot 10^{-7}$ М) и MAO-A ($K_i = 3,6 \cdot 10^{-6}$ М), мелатониновому рецептору 1 типа (MT₁ рецептор, $K_i = 1,6 \cdot 10^{-5}$ М) [3]. В научной литературе обсуждается значение Sigma1R в регуляции клеточных ответов на эмоциональный стресс, установлен вклад шаперона в регуляцию фолдинга белков и предотвращение стресса эндоплазматического ретикула [4]. Активность фермента NQO2 может способствовать образованию активных форм кислорода в процессе восстановления эндогенных хинонных производных катехоламинов в цитозоле нейронов [5]. В экспериментах *in vitro* выявлено ингибирование митохонд-

риальной MAO-A головного мозга крыс в присутствии фабомотизола [6], что согласуется с данными о вкладе MAO-A в реакции на социальный стресс и развитие тревожных расстройств. Значение MT₁ рецептора для регуляции тревожного поведения показано с использованием различных поведенческих тестов [7].

С целью изучения механизмов анксиолитического действия фабомотизола был проведён анализ профиля экспрессии генов в головном мозге крыс линии MR (Maudsley Reactive; характеризуются реакцией замирания при стрессовом воздействии) в условиях моделирования эмоционального стресса (тест ОП). Содержание мРНК генов оценивали с использованием коммерческих макрочипов Atlas[®] cDNA Expression Array (#7738-1; “BD Biosciences”), содержащих 1176 амплифицированных фрагментов кДНК генов крысы. Фабомотизол вводили однократно внутривентриально в дозе 12 мг/кг за 30 мин до экспозиции в ОП. Через 1 час после введения препарата животных декапитировали. Получение образцов РНК из мозга контрольных (ОП + дистиллированная вода; 6 крыс), опытных крыс (ОП + фабомотизол; 6 крыс) и все последующие манипуляции проводили в соответствии с протоколами производителя. Гены, уровень транскриптов которых изменялся не менее чем в 1,5 раза, далее верифицировали методом количественной ОТ-ПЦР в режиме реального времени по методу сравнения пороговых циклов (метод $\Delta\Delta C_t$) в двух независимых экспериментах.

¹ Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова, Москва

² Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской Академии наук, Уфа

* E-mail: juvv73@gmail.com

Таблица 1. Функциональная кластеризация дифференциально экспрессирующихся генов в мозге крыс MR при действии фабомотизола в условиях эмоционально-стрессового воздействия

| Биологический процесс; название гена / изменение уровня мРНК гена | Термин генов онтологий (GO) |
|--|---|
| Трансляция белков | |
| <i>Rpl15</i> (рибосомный белок L15) / $0,61 \pm 0,06$ ($p = 0,01$) <i>Rpl5</i> (рибосомный белок L5) / $0,63 \pm 0,08$ ($p = 0,04$) <i>Ncl</i> (нуклеолин) / $0,34 \pm 0,11$ ($p = 0,04$) <i>Ybx1</i> (Y-бокс-связывающий белок 1) / $0,13 \pm 0,02$ ($p = 0,02$) | Трансляция (GO:0006412), $p^* = 3,08 \cdot 10^{-6}$ Экспрессия генов (GO:0010467), $p^* = 1,30 \cdot 10^{-3}$ Биогенез рибосом (GO:0042254), $p^* = 0,37 \cdot 10^{-2}$ |
| Регуляция синаптических функций | |
| <i>Cplx2</i> (комплексин 2) / $0,46 \pm 0,13$ ($p = 0,04$) <i>Dlg4</i> (белок PSD-95) / $1,94 \pm 0,05$ ($p = 0,00$) <i>Syngap1</i> (RasGap 1 белок) / $0,21 \pm 0,02$ ($p = 0,03$) <i>Add1</i> (аддуцин 1) / $4,10 \pm 0,30$ ($p = 0,02$) <i>Rab8b</i> (малый ГТФ-связывающий белок 8b) / $3,86 \pm 0,21$ ($p = 0,04$) <i>Klc1</i> (легкая цепь 1 кинезина) / $0,62 \pm 0,06$ ($p = 0,03$) <i>Chn1</i> (химерин 1) / $1,60 \pm 0,13$ ($p = 0,02$) | Синаптическая локализация белков (GO:0035418), $p^* = 0,20 \cdot 10^{-3}$ Экзоцитоз везикул (GO:0006904), $p^* = 5,80 \cdot 10^{-3}$ Везикулярный транспорт (GO:0060627), $p^* = 2,11 \cdot 10^{-2}$ Внутриклеточный транспорт (GO:1990778), $p^* = 3,46 \cdot 10^{-2}$ Сигнальная трансдукция (GO:0050794), $p^* = 1,38 \cdot 10^{-2}$ |
| Клеточный метаболизм | |
| <i>Akr1d1</i> ($\Delta(4)$ -3-кетостероид 5- β -редуктаза) / $5,00 \pm 0,23$ ($p = 0,02$) <i>Vcat1</i> (трансаминаза аминокислот с разветвленной цепью) / $1,34 \pm 0,17$ ($p = 0,00$) <i>Pkm</i> (пируваткиназа) / $0,55 \pm 0,02$ ($p = 0,02$) | Реакции синтеза органических соединений (GO:1901576), $p^* = 1,94 \cdot 10^{-5}$ Биосинтез (GO:0044249), $p^* = 1,85 \cdot 10^{-5}$ Синтез внутриклеточных макромолекул (GO:0034645), $p^* = 1,10 \cdot 10^{-3}$ |

Примечания. Для статистической обработки данных применяли критерий Вилкоксона. Данные представлены в виде $M \pm SEM$; p – достоверность отличий уровня мРНК; GO – идентификатор функциональной категории (биологического процесса) по классификации базы данных “Gene Ontology”; p^* – уровень значимости с поправкой на множественные сравнения Бенджамини–Хохберга, характеризующей правильность отнесения данного набора генов к определенному биологическому процессу.

Введение фабомотизола за 30 мин до помещения в ОП вызывает изменение экспрессии 14 генов в головном мозге крыс линии MR. Функциональную аннотацию и кластеризацию дифференциально экспрессирующихся генов проводили с помощью web-ресурса “DAVID” (www.david.abcc.ncifcrf.gov) (табл. 1). Как следует из полученных данных, фабомотизол *in vivo* на фоне стрессового воздействия снижает уровень мРНК генов *Rpl5*, *Rpl15*, *Ncl*, *Ybx1*, продукты которых вовлечены в биогенез рибосом, связывание ДНК и РНК, являются компонентами рибосом и рубонуклеопротеидных комплексов. Белковые продукты указанных генов непосредственно не участвуют в формировании тревожных реакций, однако снижение уровня их мРНК при действии фабомотизола может указывать на активацию механизмов клеточного гомеостаза, направленных на нормализацию индуцированных стрессом изменений соотношения трансляции/деградации белков [8]. Не исключено, что подавление экспрессии генов, связанных с рибонуклеопротеидными комплексами может отражать один из механизмов цитопротективных свойств фабомотизола, опосредованных Sigma1R/IRE1 – зависимым путём регуляции биогенеза рибосом и уровня трансляции белков.

Анализ литературных данных показывает, что механизмы действия фабомотизола, вероятно, связаны с регуляцией синаптических функций, о чём свидетельствуют изменения уровня мРНК генов *Cplx2*, *Dlg4*, *Syngap1*, *Add1*, *Rab8b*, *Klc1*, *Chn1*. Белковые продукты этих генов вовлечены в процессы экзоцитоза (CPLX2), внутриклеточного транспорта (KLC1, RAB8B), регуляции цитоскелета (ADD1) и изменения структуры дендритов и синапсов (CHN1, SYNGAP1, DLG4). Гены *Dlg4* и *Syngap1* кодируют белки – компоненты постсинаптической плотности, которые опосредуют сопряжение NMDA рецепторов с внутриклеточными путями передачи сигнала [9].

Многочисленные экспериментальные данные позволяют рассматривать Sigma1R в качестве лиганд-активируемого белка-скаффолда, участвующего в процессах внутриклеточного транспорта и перераспределения/локализации многих белков. Известно, что при стимуляции агонистами Sigma1R транслоцируется в область цитоплазматической и ядерной мембран. При перемещении к мембране Sigma1R взаимодействует с рецепторами, потенциал- и лиганд-активируемыми ионными каналами, ферментами, протеинкиназами и регулирует их функциональную активность [10]. Результаты имму-

нофлуоресцентного анализа *in vitro* и данные специфического связывания [³H](+)-пентазоцина в P2 и P3 фракциях гомогенатов головного мозга мышей указывают на транслокацию Sigma1R в область цитоплазматической мембраны при действии фабомотизола [11, 12]. Изменения экспрессии генов, относящихся к группе “синаптические функции”, могут отражать участие их белковых продуктов в обеспечении индуцированной фабомотизолом транслокации и локализации самого Sigma1R и/или других рецепторов и белков, вовлечённых в фармакологические эффекты препарата.

Функциональный кластер “клеточный метаболизм” представлен генами *Akr1d1*, *Vcat1*, *Pkm*. Наибольший интерес, на наш взгляд, представляет ген *Akr1d1*, белковый продукт которого катализирует реакцию восстановления С-19 и С-21 стероидов в 5β-восстановленные метаболиты. Одним из метаболитов прогестерона, образованных посредством Δ(4)-3-кетостероид 5-β-редуктазы, является нейростероид прегнанонон (3α-гидрокси-5β-прегнан-20-он), который является позитивным аллостерическим модулятором ГАМК_A рецепторов, потенцирует эффекты эндогенной ГАМК [13]. Т. Калинина и соавт. [14] ранее показали, что у мышей BALB/с анксиолитический эффект фабомотизола зависит от функциональной активности митохондриального транслокационного белка 18 кДа (TSPO) и 5α-редуктазы, в частности, препарат потенцирует поведенческие эффекты блокады 5α-редуктазы. Основываясь на литературных данных об участии Sigma1R в комплексе с белками StAR, VDAC2 и TSPO в переносе холестерина в митохондрии, можно предположить, что в анксиолитический эффект фабомотизола вносит вклад усиление переноса холестерина в митохондрии с последующим повышением нейростероидогенеза [15].

Основываясь на литературных данных и проведенном биоинформационном анализе, можно заключить, что изменения экспрессии генов при действии фабомотизола могут быть преимущественно ассоциированы с функциями Sigma1R, не исключая регуляции экспрессии, опосредованной взаимодействием фабомотизола с другими мишенями (NQO2, MT₁ рецепторы, MAO-A). Полученные нами экспе-

риментальные данные о спектре генов, дифференциально регулируемых фабомотизолом в клетках мозга крыс линии MR после однократного его введения, позволяют оценить вклад различных генетических систем в реализацию свойств препарата и создают основу для понимания механизмов фармакологической регуляции Sigma1R.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках темы госзадания ФГБНУ “Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова” № 0521–2019–0001.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Незнамов Г.Г., Сюняков С.А., Чумаков Д.В. и др. // Психиатрия и психофармакотерапия. 2006. Т. 8. № 4. С. 8–13.
2. Середенин С.Б., Воронина Т.А., Незнамов Г.Г. и др. // Вест. РАМН. 1998. № 11. С. 3–9.
3. Середенин С.Б., Воронин М.В. // Экспер. клин. фармакол. 2009. Т. 72. № 1. С. 3–11.
4. Hayashi T. // Psych. Clin. Neurosci. 2015. V. 69. № 4. P. 179–191.
5. Cassagnes L.E., Chhour M., Perio P., et al. // Free Radic. Biol. Med. 2018. V. 120. P. 56–61.
6. Воронин М.В., Аксенова Л.Н., Бунеева О.А. и др. // Бюл. эксперим. биол. мед. 2009. V. 147. № 7. С. 31–33.
7. Liu J., Clough S.J., Dubocovich M.L. // Genes, brain, behav. 2017. V. 16. № 5. P. 546–553.
8. Darnell J.C. // Curr. Opin. Genet. Dev. 2011. V. 21. № 4. P. 465–473.
9. Chen X., Nelson C.D., Li X., Winters C.A., et al. // J. Neurosci. 2011. V. 31. № 17. P. 6329–6338.
10. Su T.P., Hayashi T., Maurice T., et al. // Trends Pharmacol. Sci. 2010. V. 31. № 12. P. 557–566.
11. Середенин С.Б., Антипова Т.А., Воронин М.В. и др. // Бюл. эксперим. биол. мед. 2009. V. 148. № 7. С. 53–55.
12. Абрамова Е.В., Воронин М.В., Середенин С.Б. // Экспер. клин. фармакол. 2017. Т. 80. № 2. С. 3–7.
13. Lambert J.J., Cooper M.A., Simmons R.D., et al. // Psychoneuroendocrinol. 2009. V. 34. Suppl. 1. S48–58.
14. Kalinina T., Shimshirt A., Kudryashov N., et al. // Eur. Neuropsychopharmacol. 2019. V. 29. S.499–S500.
15. Marriott K.S., Prasad M., Thapliyal V., et al. // J. Pharm. Exp. Ther. 2012. V. 343. № 3. P. 578–586.

EFFECT OF FABOMOTIZOLE ON BRAIN GENE EXPRESSION IN MR RATS UPON OPEN FIELD TEST

Yu. V. Vakhitova¹, U. Sh. Kuzmina², M. V. Voronin¹, L. F. Zainullina¹,
Academician of the RAS S. B. Seredenin¹

¹*Zakusov Research Institute of Pharmacology, Moscow, Russian Federation*

²*Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Science, Ufa, Russian Federation*

Received April 16, 2019

Selective anxiolytic fabomotisol (Afobazol[®]) has affinity for the Sigma-1 chaperone receptor site, quinone reductase 2 (NQO2) and MAO-A regulatory sites, and melatonin receptor type 1 (MT1 receptor). The analysis of the effect of fabomotisol on the gene expression profile in the brain of MR (Maudsley Reactive) rats was carried out when modeling emotional stress in the open field test. A change in the expression of 14 genes was found, the results of the functional annotation of which show that the mechanisms of action of fabomotisol may be associated with the regulation of translation of proteins (*Rpl5*, *Rpl15*, *Ncl*, *Ybx1*), synaptic functions (*Cplx2*, *Dlg4*, *Syngap1*, *Add1*, *Rab8b*, *Klc1*, *Chn1*) and cellular metabolism (*Akr1d1*, *Bcat1*, *Pkm*).

Keywords: anxiolytics, fabomotizole, Sigma1 receptor, gene expression, emotional stress reactions.