

На правах рукописи

АБРАМОВА ЕЛЕНА ВЛАДИМИРОВНА

**АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АФОБАЗОЛА
С СИГМА-1 РЕЦЕПТОРАМИ**

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»

Научный руководитель:

академик РАН,
доктор медицинских наук,
профессор

Середенин Сергей Борисович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук,
профессор, заведующий кафедрой
фармакологии ФГБОУ ВО ПСПбГМУ
им. И.П. Павлова Минздрава России,
директор Института фармакологии
имени А.В. Вальдмана

Звартау Эдвин Эдуардович

доктор биологических наук,
профессор, заведующий лабораторией
молекулярной генетики соматических
клеток ФГБУН Институт молекулярной
генетики РАН

Гривенников Игорь Анатольевич

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «__» _____ 2017 г. в ____ ч на заседании диссертационного совета Д. 001.024.01. на базе ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» по адресу: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ученой части ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» по адресу: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8 и на сайте www.academpharm.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук,
профессор

Вальдман Елена Артуровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Афобазол (5-этокси-2-[2-(морфолино)-этилтио] бензимидазола дигидрохлорид) синтезирован и фармакологически изучен в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (Патент РФ №2061686 от 10.06.1996). В 2006 году препарат внедрен в медицинскую практику в качестве анксиолитика (№ ЛС – 000861). Селективные анксиолитические свойства афобазола охарактеризованы в ряде экспериментальных и клинических работ (Середенин С.Б. и др. Вестник Российской академии медицинских наук. 1998. 11. С. 3-9; Незнамов Г.Г. и др. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2001. Т. 64(2). С. 15-19). В исследованиях *in vitro* установлены лигандные взаимодействия афобазола с МТ₁, МТ₃, сигма-1 рецепторами (Sigma1R, $\sigma 1$) и рецепторным участком MAO A (Середенин С.Б., Воронин М.В. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2009. Т. 72(1). С. 3-11).

Множественность нейрохимических мишеней препарата требует детального изучения каждого из установленных взаимодействий, что необходимо для понимания механизмов формирования клеточного ответа и фармакологического эффекта афобазола. Последнее дает возможность определения новых показаний назначения афобазола, создания рациональных схем его применения, построения гипотез о новых фармакологических средствах, селективно воздействующих на специфичные для афобазола мишени. Поэтому в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова была поставлена задача комплексного изучения фармакодинамики афобазола.

Настоящая работа посвящена исследованию взаимодействия афобазола с Sigma1R.

Sigma1R – сравнительно недавно открытый трансмембранный белок-шаперон, локализованный преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме, в областях, граничащих с митохондриями (Su T. P., et al. Trends in Pharmacological Sciences. 2010. V. 31(12). P. 557-566). Физиологическая роль Sigma1R состоит в выполнении шаперонных функций, в восстановлении 3D конформации измененных белков клетки (Pabba M. Frontiers in Cellular Neuroscience. 2013. 7. P. 50). Описаны взаимодействия Sigma1R с тирозинкиназными рецепторами, с рецепторами, связанными с G белками, с ионными каналами (Na⁺, K⁺, NMDA, VRCC, ASIC), с фосфолипазой C (Su T. P., et al. Trends in Pharmacological Sciences. 2010. V. 31(12). P. 557-566). Sigma1R стабилизируют инозитол 1,4,5-трисфосфатные рецепторы (ИФ3Р), пролонгируя высвобождение Ca²⁺ в митохондрии, опосредуя таким образом активацию биоэнергетического обмена в клетке, снижают синтез активных форм кислорода в митохондриях, ограничивая развитие ЭПР стресса (Hayashi T., Su T. P. Cell. 2007. V. 131(3). P. 596-610). Многочисленные эффекты Sigma1R в конечном итоге повышают выживаемость клеток

в неблагоприятных условиях (Hayashi T. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*. 2015. V. 69(4). P. 179-191).

Sigma1R экспрессирован в тканях органов большинства систем организма, в том числе и в ЦНС, что определяет его в качестве перспективной мишени терапии болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, шизофрении, депрессивных расстройств (Nguyen L., et al. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2015. V. 127(1). P. 17-29). Лиганды Sigma1R разнообразны по химической структуре и фармакологическим эффектам. Среди препаратов, широко применяемых в клинике, афинностью к Sigma1R обладают ингибитор ацетилхолинэстеразы донепезил, антидепрессанты флуоксетин, сертралин, имипрамин, нейролептик галоперидол, нейростероиды прегненолон-сульфат, дигидроэпиандростерон, противокашлевые средства декстрометорфан, карбопентан и др (Cobos E.J., et al. *Current Neuropharmacology*. 2008. V. 6(4). P. 344-366).

Фармакодинамические эффекты Sigma1R, связанные с его лигандной активацией, до конца не ясны, имеют свою специфику для каждого из установленных лигандов и, поэтому требуют детального изучения. Более того, в литературе отсутствует окончательное определение агонистических и антагонистических свойств лигандов по отношению к Sigma1R. Группа T. Hayashi, имеющая наибольший опыт в изучении структурно-функциональных особенностей Sigma1R, постулировала, что для характеристики лиганда в качестве агониста необходимо доказать способность вызывать транслокацию Sigma1R в область цитоплазматической мембраны (Hayashi T., Su T. P. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2003. V. 306(2). P. 726-733; Hayashi T., Su T. P. *Current Neuropharmacology*. 2005. V. 3(4). P. 267-280).

Степень разработанности проблемы. Фундаментальные исследования, выполненные со времени идентификации Sigma1R в 1976 году, позволили установить их важную физиологическую роль как шаперонов, способствующих поддержанию 3D конформации функционально значимых белковых макромолекул клетки, рецепторов, ионных каналов, ферментов и др. Рассмотрены механизмы активации Sigma1R при аверсивных воздействиях на клетку (Hayashi T., Su T. P. *Cell*. 2007. V. 131(3). P. 596-610).

Другой важный блок исследований связан с изучением лигандных свойств, механизмов лигандной активации, поиску эндо- и экзогенных лигандов. Последние обнаружены среди лекарственных средств лечения ряда нервно-психических заболеваний, что обусловило активное изыскание новых оригинальных соединений, связывающихся с Sigma1R, перспективных для создания нейропротекторов и антидепрессантов. Фармакологические исследования концентрировались на изучении зависимости лигандных свойств от химической структуры с последующей оценкой отобранных соединений в доклинических разработках с использованием стандартных

экспериментальных моделей для данных групп лекарств (Hayashi T., Su T. P. CNS Drugs. 2004. V. 18(5). P. 269-284; Hayashi T., Stahl S. M. Drugs of the Future. 2009. V. 34(2). P. 137-146).

Однако, до настоящего времени поисковые работы не завершились успешными клиническими исследованиями. Открытыми остаются вопросы характера взаимодействия лигандов с Sigma1R, определения агонистических свойств в свете наиболее обоснованной в фундаментальных исследованиях концепции о способности агонистов вызывать транслокацию Sigma1R из ЭПР в область цитоплазматической и ядерной мембран.

В доступной литературе не обнаружено данных об участии Sigma1R в формировании реакций на эмоциональный стресс, в механизмах действия анксиолитиков.

Поэтому, исходя из данных об анксиолитических свойствах афобазола и установленных в модельных экспериментах *in vitro* лигандных свойствах препарата к Sigma1R (Середенин С.Б., Воронин М.В. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2009. Т. 72(1). С. 3-11; Незнамов Г.Г. и др. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2001. Т. 64(2). С. 15-19), в настоящем исследовании изучено взаимодействие афобазола с Sigma1R при эмоционально-стрессовых воздействиях с использованием фармакогенетической методологии, учитывающей различия в фенотипах эмоционально-стрессовых реакций.

Цель исследования. Целью настоящей работы явилось выявление характера лигандных взаимодействий и изменений внутриклеточной локализации Sigma1R при связывании с афобазолом у интактных животных и в условиях эмоционального стресса.

Задачи исследования. Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Определить аффинность афобазола к Sigma1R в P2 фракции гомогенатов головного мозга мышей линии CD-1 в сравнении с известными лигандами.
2. Установить значения параметра IC₅₀ афобазола при конкурентном взаимодействии с прототипными лигандами Sigma1R [³H](+)-пентазоцином и [G-³H]PRE-084 в P2 фракции гомогенатов головного мозга аутбредных мышей CD-1 и инбредных C57BL/6 и BALB/c, отличающихся по эмоционально-стрессовой реакции.
3. Исследовать специфическое связывание [³H](+)-пентазоцина с Sigma1R в P2 и P3 фракциях гомогенатов головного мозга интактных мышей линий CD-1, C57BL/6 и BALB/c *in vitro*.

4. Изучить влияние афобазола в анксиолитической дозе на специфическое связывание [³H](+)-пентазоцина с Sigma1R в P2 и P3 фракциях гомогенатов головного мозга мышей линий CD-1, C57BL/6 и BALB/c при эмоционально-стрессовых воздействиях.
5. Методом иммунофлюоресценции провести качественный анализ влияния афобазола на внутриклеточную локализацию липидных рафтов и Sigma1R в культуре живых астроцитов человека.

Научная новизна. Методом радиолигандного анализа доказано, что афобазол является лигандом Sigma1R, обладающим афинностью, близкой по значению к эндогенным лигандам рецептора.

Установлено, что афобазол в дозе 5 мг/кг увеличивает специфическое связывание [³H](+)-пентазоцина с Sigma1R в P2 фракции гомогенатов головного мозга мышей линии CD-1.

Показано, что при конкурентном взаимодействии афобазола с [³H](+)-пентазоцином в P2 фракциях гомогенатов головного мозга мышей линий CD-1, BALB/c, C57BL/6 и [G-³H]PRE-084 у C57BL/6 предпочтительна модель с одним сайтом связывания. Конкурентное вытеснение [G-³H]PRE-084 у CD-1 и BALB/c описывается моделью с двумя сайтами связывания.

Выявлены изменения и межлинейные различия в специфическом связывании [³H](+)-пентазоцина у инбредных мышей с разными фенотипами ответа на стресс и аутбредных животных при эмоционально-стрессовых воздействиях и введении афобазола.

Методом иммунофлюоресценции качественно показано внутриклеточное перераспределение липидных рафтов в живых астроцитах человека в область цитоплазматической и ядерной мембран при инкубации с афобазолом в концентрации 10⁻⁵ М в течение 30 и 60 минут и колокализация липидных рафтов с Sigma1R.

Теоретическая и практическая значимость. Установленные результаты доказали лигандные свойства афобазола по отношению к Sigma1R и позволили определить анксиолитик в качестве агониста Sigma1R, что обусловило целесообразность дальнейшего фармакологического изучения в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова афобазола в качестве цито- и нейропротектора и разработку новых показаний назначения афобазола. Эти результаты и материалы диссертационного исследования включены в формируемое регистрационное досье для расширения области медицинского применения афобазола.

Доказанное отсутствие значимых взаимодействий с Sigma1R основного метаболита афобазола соединения М-11 позволило применить сравнительный анализ

фармакологических эффектов M-11 и афобазола для изучения механизмов действия анксиолитика.

Методология и методы исследования. В настоящей работе использована фармакогенетическая методология с применением физиологических, фармакологических методов, радиолигандного и иммунофлюоресцентного анализа.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Определены характеристики рецепторного взаимодействия афобазола с Sigma1R в сравнении со стандартными экзогенными лигандами и эндогенным лигандом прогестероном. Установленная аффинность афобазола ($IC_{50}=2,7*10^{-5}$ моль/л) близка к аффинности прогестерона ($IC_{50}=9,02*10^{-6}$ моль/л).
2. Интактные инбредные мыши с разным фенотипом эмоционально-стрессовой реакции и аутбредные животные не различаются по характеристикам взаимодействия лиганда с рецептором. Изменения возникают при эмоционально-стрессовых воздействиях и введении афобазола.
3. Эмоционально-стрессовые воздействия вызывают активацию и транспорт Sigma1R в область цитоплазматической мембраны.
4. Афобазол способен изменять специфическое связывание [3H](+)-пентазоцина в P2 фракциях гомогенатов головного мозга мышей, что свидетельствует о транслокации рецептора в область цитоплазматической мембраны и характеризует афобазол в качестве агониста рецептора.
5. В живых астроцитах человека установлена колокализация Sigma1R и липидных рафтов.

Степень достоверности. Экспериментальные данные получены с использованием известных и хорошо воспроизводимых методов исследования. Статистическая обработка полученных данных проведена с применением современных методов математической статистики, что гарантирует высокую степень достоверности полученных результатов.

Личный вклад соискателя заключается в самостоятельной подготовке обзора литературы, выполнении экспериментальной части, проведении статистической обработки данных. Автором самостоятельно воспроизведена и скорректирована методика радиолигандного анализа. При непосредственном участии автора подготовлены публикации по результатам исследований.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы представлены в материалах международных конференций «The 28th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology» (Стокгольм, 2012), «The 42th Annual Meeting, Society for Neuroscience» (Новый Орлеан, 2012), «The 29th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology» (Ванкувер, 2014), доложены на IV съезде фармакологов

России «Инновации в современной фармакологии» (Казань, 2012), всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Проблемы разработки новых лекарственных средств» (Москва, 2013), всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Достижения современной фармакологической науки» (Рязань, 2015), 6-ой международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам» (Клязьма, 2015), международном конгрессе «BIT's 14th Annual Congress of International Drug Discovery Science and Technology» (Сеул, 2016), на расширенном заседании отдела фармакогенетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В.Закусова» (Москва, 2017).

Публикации. По результатам исследований опубликованы 3 статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, и 8 тезисов в материалах российских и международных конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 131 странице машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, использованных в исследованиях, результатов исследований, обсуждения, выводов. Работа содержит 23 рисунка и 10 таблиц. Список литературы включает 208 источников, из них 12 отечественных и 196 зарубежных.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы исследования

Взаимодействие афобазола с Sigma1R изучали радиолигандным методом в P2 и P3 фракциях гомогенатов головного мозга мышей-самцов аутбредной линии CD-1 и инбредных линий C57BL/6 и BALB/c и методом иммунофлюоресцентного окрашивания в культуре живых астроцитов человека.

Препараты

Использовали субстанцию афобазола (5-этокси-2-[2-(морфолино)-этилтио]бензимидазола дигидрохлорид), соединение М-11 (2-[2-(3-оксоморфолин-4-ил)этилтио]-5-этоксibenзимидазола гидрохлорид), синтезированные в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Экспериментальные животные

Материал для радиолигандного анализа получали от мышей-самцов аутбредной линии CD-1 и инбредных линий C57BL/6 и BALB/c (НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН) массой 18-25 г.

Животные каждой линии были разделены на 6 групп: интактные; подвергнутые процедуре внутрибрюшинной инъекции контрольного раствора; с внутрибрюшинной инъекцией афобазола; тестированные в «Открытом поле»; с внутрибрюшинной инъекцией контрольного раствора и последующей

экспозицией в «Открытом поле»; с внутрибрюшинной инъекцией афобазола и последующей экспозицией в «Открытом поле».

Эмоционально-стрессовые воздействия моделировали в тесте «Открытое поле» в модификации П.М. Бородин (Бородин П. М. Шюллер Л., Беляев Д. К. Генетика. 1976. Т. 12(12). С. 62-71) процедурой внутрибрюшинной инъекции и последовательными воздействиями внутрибрюшинной инъекции и экспозиции в «Открытом поле».

Афобазол в растворе дистиллированной воды вводили внутрибрюшинно в анксиолитической дозе 5 мг/кг, из расчета 0,1 мл/10 г веса мыши. В качестве контроля использовали растворитель. Мышам CD-1 контрольный раствор или афобазол вводили за 15, 30 и 60 мин до эвтаназии, мышам C57BL/6 и BALB/c за 30 мин до эвтаназии. Животным всех линий из групп с внутрибрюшинной инъекцией афобазола или контрольного раствора с последующим тестированием в «Открытом поле», афобазол или контрольный раствор вводили за 30 мин до помещения в темную камеру.

Эвтаназию животных проводили методом цервикальной дислокации с последующей декапитацией.

Радиолигандный анализ

В качестве меченых лигандов использовали [³H](+)-пентазоцин (PerkinElmer) (удельная активность 29 Ки/ммоль) и [G-³H] PRE-084 (ФГБУН ИМГ РАН, 110 Ки/ммоль) в конечных концентрациях 1 и 0,8 нмоль/л соответственно. Конкурентное взаимодействие афобазола, M-11 и известных лигандов Sigma1R (все Sigma-Aldrich), с [³H](+)-пентазоцином проводили в P2 фракциях головного мозга интактных мышей линии CD-1 по протоколу (Ряскина Е.В., Воронин М.В., Середенин С.Б. Химико-фармацевтический журнал. 2012. Т. 46(6). С. 12-13). Конечные концентрации холодных лигандов использовали в диапазоне 10⁻³ – 10⁻¹⁰ моль/л. Определяли параметры IC₅₀ исследуемых соединений.

Конкурентное взаимодействие афобазола с [³H](+)-пентазоцином и [G-³H] PRE-084 в P2 фракциях гомогенатов головного мозга интактных мышей линий CD-1, C57BL/6 и BALB/c исследовали по протоколу (Е.В. Абрамова, Воронин М.В., Середенин С.Б. Химико-фармацевтический журнал. 2015. Т. 49(1). С. 9-11).

Специфическое связывание [³H](+)-пентазоцина в P2 и P3 мембранных фракциях определяли по протоколу, описанному в работе (Абрамова Е.В., Воронин М.В., Середенин С.Б. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2017. Т. 80(2). С. 45-49).

Специфическое связывание выражалось в виде DPM (Disintegrations per minute, радиоактивный распад за минуту). Значения DPM нормировались к содержанию белка в каждой пробе (DPM/мг белка).

Концентрацию белка в пробах определяли методом Lowry (Lowry O. H., et al. Journal of Biological Chemistry. 1951. V. 193(1). P. 265-275). Оптическую плотность ($\lambda=700$ нм) измеряли на спектрофотометре Genesys 10 UV (Thermo electron corporation) для каждой пробы в трех повторениях.

Статистическая обработка данных

Статистический анализ полученных данных, математические расчеты и графическое представление данных проводили с применением программного продукта GraphPad Prism version 6.01 for Windows. Проверку экспериментальных данных на соответствие нормальному распределению осуществляли с помощью универсального критерия D'Agostino & Pearson. Для статистической обработки полученных данных применяли F- тест Фишера, t-тест Стьюдента и непараметрический критерий U-тест Манна-Уитни, дисперсионный анализ ANOVA.

Метод иммунофлюоресцентного окрашивания

Мечение липидных рафтов проводили в живых астроцитах человека с помощью набора Molecular probes' Vybrant® Alexa Fluor® 555 Lipid Raft Labeling Kit по протоколу (<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp34403.pdf>). Афобазол вносили в ростовую среду в концентрации 10^{-5} моль/л. Флюоресценцию красителя, ассоциированного с липидными рафтами, оценивали непосредственно перед внесением афобазола в ростовую среду и через 30 и 60 минут инкубации с препаратом в указанных концентрациях.

Одновременную визуализацию Sigma1R и липидных рафтов проводили непрямым иммуноцитохимическим анализом. Астроциты с мечеными липидными рафтами промывали бессывороточной средой, после чего инкубировали с раствором первичных антител к Sigma1R (Abcam® rabbit anti-OPRS1 antibody) в течение часа при 37°C . Затем препараты трехкратно промывали PBS, вносили вторичные антитела (Molecular probes® Alexa fluor® 488 goat anti-rabbit IgG antibody) и инкубировали 1 час при 37°C (1:500). Флюоресцентная визуализация липидных рафтов и Sigma1R в присутствии афобазола производилась перед внесением афобазола в ростовую среду и через 15, 30 и 60 минут после внесения. Афобазол применяли в конечной концентрации 10^{-5} моль/л. Съёмка производилось с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Nikon A1R MP+ в реальном масштабе времени.

Обработка данных

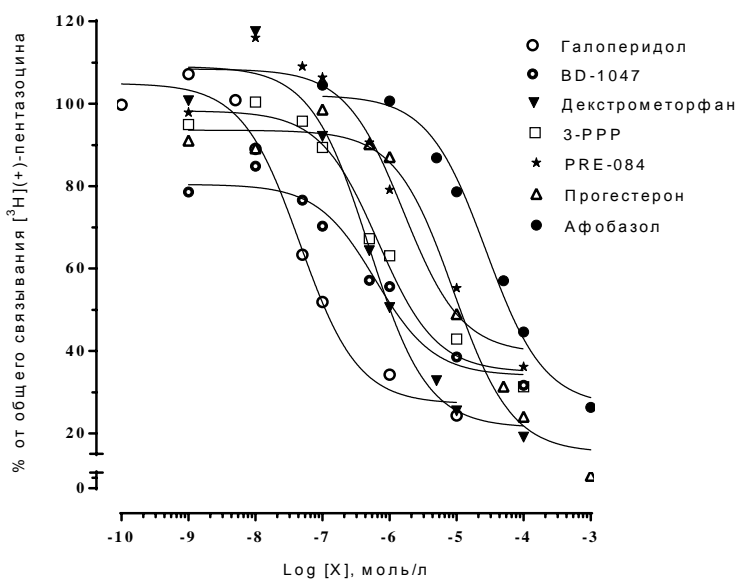
Полученные изображения обрабатывались с помощью программного обеспечения NIS-Elements AR. Изменение флюоресценции красителя, ассоциированного с липидными рафтами, при изучении влияния афобазола на липидные рафты цитоплазматической мембраны оценивали качественно. Для определения колокализации Sigma1R и липидных рафтов проводили сравнение интенсивностей

каналов флюоресценции красителей, ассоциированных с липидными рафтами и Sigma1R, и рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона (r).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ аффинности афобазола к Sigma1R в P2 фракции головного мозга интактных мышей CD-1 при конкурентном взаимодействии с [³H](+)-пентазоцином

Кривые конкурентного вытеснения [³H](+)-пентазоцина афобазолом в сравнении с экзогенными лигандами Sigma1R галоперидолом, декстрометорфаном, BD-1047, 3-PPP, PRE-084 и эндогенным прогестероном представлены на рисунке 1. Значение IC₅₀ для афобазола оказалось близким к таковому для прогестерона, что позволило характеризовать аффинность афобазола к Sigma1R сравнимой с эндогенными лигандами рецептора и, вероятно, со сходной способностью конкуренции за сайт связывания. Учитывая, что прогестерон проявляет свойства антагониста по отношению к Sigma1R, конкуренция может приводить к снижению зависимых от Sigma1R фармакологических эффектов афобазола, что соответствует работе A. Urani с другими лигандами (Urani A., et al. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2001. V. 298(3). P. 1269-1279).



Соединения:	IC ₅₀ , моль/л
Галоперидол	4,6*10 ⁻⁸
Декстрометорфан	4,94*10 ⁻⁷
BD-1047	6,17*10 ⁻⁷
3-PPP	6,72*10 ⁻⁷
PRE-084	1,6*10 ⁻⁶
Прогестерон	9,02*10 ⁻⁶
Афобазол	2,74*10 ⁻⁵

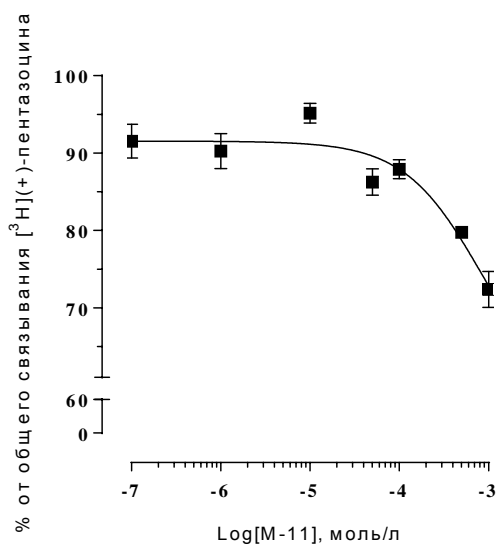
Примечания

1 Данные представлены в виде (Mean);

2 N (Афобазол)=5, (Прогестерон)=2, (PRE-084)=2, (3-PPP)=3, (BD-1047)=3, (Декстрометорфан)=1, (Галоперидол)=2, где N – количество независимых экспериментов конкурентного взаимодействия исследуемого лиганда с [³H](+)-пентазоцином.

Рисунок 1 - Конкурентное взаимодействие афобазола и лигандов Sigma1R с [³H](+)-пентазоцином в P2 фракциях гомогенатов головного мозга мышей линии CD-1

В тех же экспериментальных условиях было изучено взаимодействие основного метаболита афобазола соединения М-11 (2-[2-(3-оксоморфолин-4-ил)этилтио]-5-этоксibenзимидазола гидрохлорид) с Sigma1R. Значение IC_{50} для М-11 составило более, чем $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л, что позволяет сделать заключение об отсутствии фармакологически значимой аффинности основного метаболита афобазола к Sigma1R. Кривая конкурентного вытеснения $[^3H](+)$ -пентазоцина М-11 представлена на рисунке 2.



Примечания

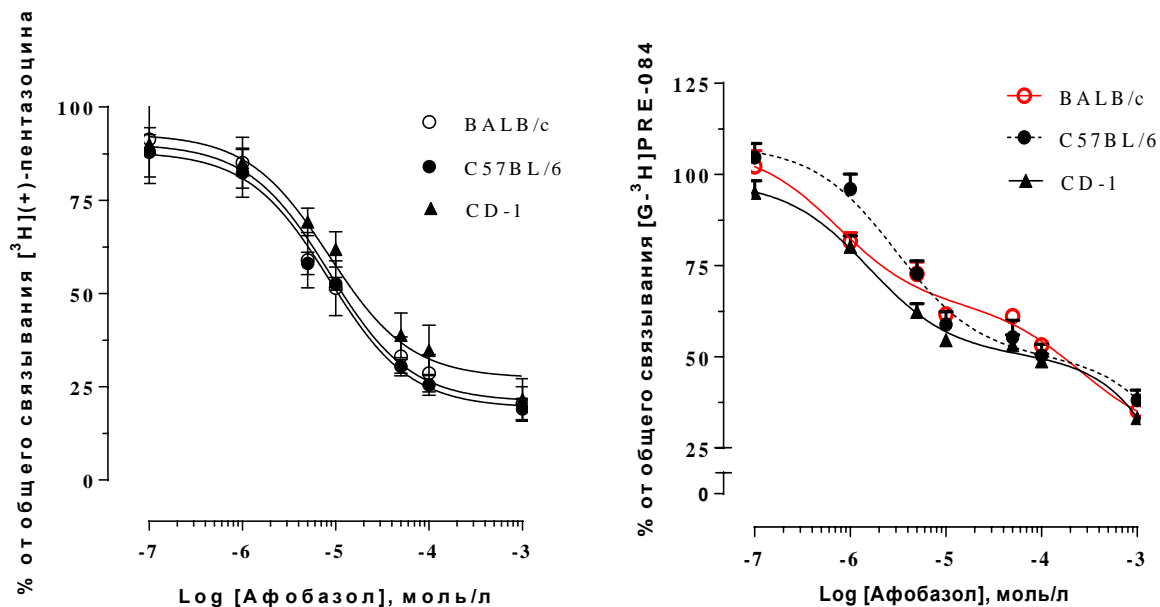
1 Данные представлены в виде (Mean±SEM);

2 N (M-11)=3, где N – количество независимых экспериментов конкурентного взаимодействия М-11 с $[^3H](+)$ -пентазоцином.

Рисунок 2 - Конкурентное взаимодействие М-11 с $[^3H](+)$ -пентазоцином в P2 фракциях гомогенатов головного мозга мышей линии CD-1

Анализ конкурентного взаимодействия афобазола с прототипными лигандами Sigma1R $[^3H](+)$ -пентазоцином и $[G-^3H]PRE-084$ в P2 фракциях гомогенатов головного мозга интактных мышей линий CD-1, BALB/c и C57BL/6 in vitro

Установлено, что кривые конкурентного вытеснения $[^3H](+)$ -пентазоцина у мышей всех трех линий описываются уравнением криволинейной регрессии с одним сайтом связывания ($p=0,59$, $p=0,82$, $p=0,76$ F-тест для CD-1, BALB/c и C57BL/6 соответственно) (рисунок 3). Сравнение значений IC_{50} афобазола $7,74 \cdot 10^{-6}$; $6,36 \cdot 10^{-6}$; $1,37 \cdot 10^{-5}$ моль/л для линий C57BL/6, BALB/c и CD-1 соответственно показало отсутствие различий в аффинности афобазола к Sigma1R ($p=0,27$ F-тест).



Примечания

1 Данные представлены в виде (Mean \pm SEM);

2 N = 3 и 6, где

N – количество независимых экспериментов конкурентного взаимодействия афобазола с [^3H](+)-пентазоцином и [^3H]PRE-084 соответственно, проведенных в P2 фракциях гомогенатов головного мозга мышей каждой линии.

Рисунок 3 - Конкурентное взаимодействие афобазола с [^3H](+)-пентазоцином и [^3H]PRE-084 в P2 фракциях гомогенатов головного мозга мышей линий CD-1, BALB/c и C57BL/6

При конкурентном вытеснении афобазолом другого прототипного лиганда Sigma1R [^3H]PRE-084 между инбредными линиями выявлены различия в предпочтительной модели лиганд – рецепторного связывания. Для мышей C57BL/6 предпочтительной оказалась модель с одним сайтом связывания ($p=0,08$ F-тест), а для BALB/c и CD-1 кривые конкурентного вытеснения подчинялись уравнению криволинейной регрессии с двумя сайтами связывания ($p=0,0001$ F-тест) (рисунок 3). Межлинейное сравнение значений $\text{IC}_{50\text{H}}$ показало, что афобазол обладает большей аффинностью к Sigma1R головного мозга мышей BALB/c ($7,36 \cdot 10^{-7}$ моль/л) в сравнении с C57BL/6 ($3,01 \cdot 10^{-6}$ моль/л) ($p=0,03$ F-тест), а различия в аффинности у мышей CD-1 ($1,58 \cdot 10^{-6}$ моль/л) в сравнении с BALB/c ($p=0,16$ F-тест) и C57BL/6 ($p=0,14$ F-тест) отсутствуют.

Полученные результаты свидетельствуют о неодинаковом лиганд-рецепторном взаимодействии [^3H]PRE-084 и [^3H](+)-пентазоцина с сайтом связывания Sigma1R, которое в соответствии с литературными данными может быть обусловлено

различиями химического строения лигандов и функционального состояния Sigma1R мышцей разных линий (Gromek K. A., et al. Journal of Biological Chemistry. 2014. V. 289(29). P. 20333-20344; Schmidt H. R., et al. Nature. 2016. V. 532(7600). P. 527-530).

Анализ различий в связывании [³H](+)-пентазоцина с Sigma1R в субклеточных P2 и P3 фракциях гомогенатов головного мозга интактных мышцей линий CD-1, BALB/c и C57BL/6

Специфическое связывание [³H](+)-пентазоцина с Sigma1R оказалось выше в P3 фракциях гомогенатов головного мозга мышцей всех трех линий (p<0,0001 t-тест), чем в P2 фракциях (таблица 1), что согласуется с данными литературы, и подтверждает локализацию Sigma1R преимущественно в области ЭПР (Hayashi T., Su T. P. PNAS. 2001. V. 98(2). P. 491-496; Hayashi T., Su T. P. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2003. V. 306(2). P. 726-733; Cobos E. J., et al. Journal of Neurochemistry. 2007. V. 102(3). P. 812-825). Межлинейных различий в рецепции радиолиганда у интактных животных не выявлено (p=0,51 и p=0,65 ANOVA для P2 и P3 фракций соответственно).

Таблица 1 - Специфическое связывание [³H](+)-пентазоцина в P2 и P3 фракциях гомогенатов головного мозга интактных мышцей линий CD-1, BALB/c и C57BL/6

Линии мышцей	P2 фракции (DPM/мг белка)	P3 фракции (DPM/мг белка)
BALB/c	3201(2938-3417)	6442(5692-7358)****
C57BL/6	3001(2458-4150)	7099(5237-8550) ****
CD-1	3241(3040-3816)	6074(5470-7536) ****

Примечания

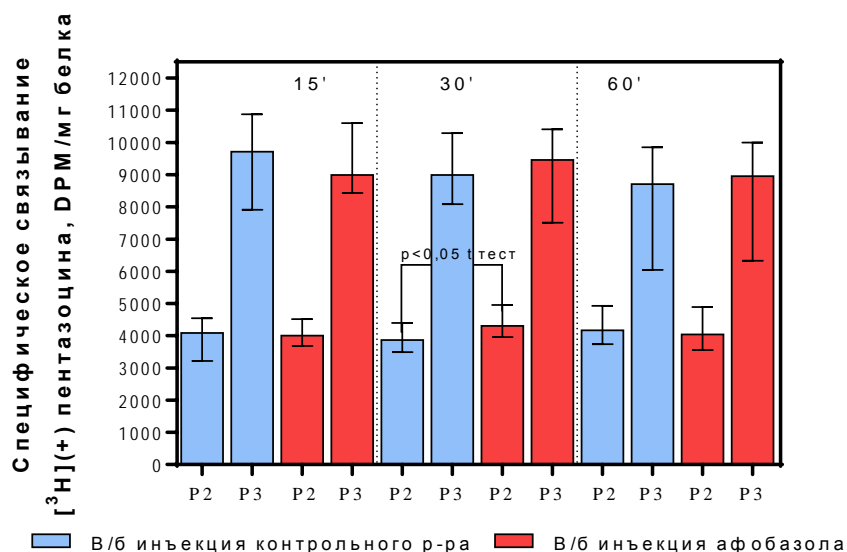
- 1 Данные представлены в виде mdn (Q25%-Q75%);
- 2 **** - p<0,0001 t тест, различие в специфическом связывании [³H](+)-пентазоцина между P2 и P3 фракциями гомогенатов головного мозга мышцей линий CD-1, BALB/c и C57BL/6;
- 3 Количество животных: BALB/c=14, C57BL/6=22, CD-1=19.

Полученные данные демонстрируют сходное распределение рецепторов в мембранных фракциях интактных аутбредных и инбредных животных с разными фенотипами эмоционально-стрессовой реакции.

Влияние афобазола на специфическое связывание [³H](+)-пентазоцина в субклеточных P2 и P3 фракциях гомогенатов головного мозга мышцей линий CD-1 *ex vivo*

Афобазол, введенный внутрибрюшинно мышцам линии CD-1 в анксиолитической дозе 5мг/кг за 30 минут до эвтаназии, в сравнении с контрольным раствором увеличивал специфическое связывание [³H](+)-пентазоцина в P2 (p<0,05 t тест) фракции гомогенатов головного мозга (рисунок 4). При введении афобазола за 15 и 60

минут изменений в рецепции не зарегистрировали, в связи с чем для дальнейших исследований избрали 30 минутный интервал.



Примечания

- 1 Данные представлены в виде mdn - interquartile range;
- 2 P2, P3 – P2 и P3 фракции гомогенатов головного мозга мышей;
- 3 Количество животных в группах: K15', A15'=19; K30', A30'=20; K60', A60'=12, где K - группа животных с внутрибрюшинной инъекцией контрольного раствора; A - группа животных с внутрибрюшинной инъекцией афобазола; 15', 30', 60' – время (мин) между внутрибрюшинной инъекцией контрольного раствора/афобазола и эвтаназией.

Рисунок 4 - Влияние афобазола на специфическое связывание [³H](+)-пентазоцина в P2 и P3 фракциях гомогенатов головного мозга мышей линии CD-1 *ex vivo*

Специфическое связывание [³H](+)-пентазоцина с Sigma1R при эмоционально-стрессовых воздействиях и введении афобазола

Анализ специфического связывания [³H](+)-пентазоцина в мембранных фракциях головного мозга мышей CD-1, BALB/c и C57BL/6, интактных, подвергнутых эмоционально-стрессовым воздействиям, при внутрибрюшинном введении афобазола, показал, что эмоциональный стресс и афобазол индуцируют изменения специфического связывания [³H](+)-пентазоцина у всех исследуемых животных, различаясь в зависимости от типа эмоционально-стрессового воздействия и линии мышей. Полученные данные графически представлены на рисунке 5.

У мышей C57BL/6, активных в анксиогенной обстановке, внутрибрюшинная инъекция контрольного раствора ($p=0,09$, $p=0,15$ t тест для P2 и P3 фракций соответственно) либо тестирование в «Открытом поле» ($p=0,22$ t тест для P2 и P3 фракций) не приводили к изменениям специфического связывания. Однако,

комплексное применение стимулов достоверно увеличивало рецепцию в обеих мембранных фракциях ($p < 0,01$, $p < 0,05$ t тест для P2 и P3 фракций соответственно).

У мышей BALB/c с меньшим порогом эмоционально-стрессовой реакции и аутбредной линии CD-1 контрольная инъекция приводила к статистически значимому подъему специфического связывания [^3H](+)-пентазоцина в обеих мембранных фракциях в сравнении с интактными животными ($p < 0,05$, $p < 0,0001$ t тест для P2 и $p < 0,0001$, $p < 0,005$ t тест для P3 фракций соответственно). Экспозиция в «Открытом поле» повышала рецепцию радиолиганда в P3 фракции у BALB/c ($p < 0,05$ t тест) и снижала рецепцию в P2 фракции у CD-1 ($p < 0,005$ U тест). При совместном применении обоих стимулов рецепция у BALB/c и CD-1 оказалась сходной с интактными животными.

Выявленные изменения рецепторного связывания в мембранных фракциях свидетельствуют о транслокации рецепторов и согласуются с представлениями об индукции ЭПР стресса при эмоционально-стрессовых воздействиях (Hayashi T. *Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 2015. V. 69(4). P. 179-191).

Однако, в отдельных опытах, например, у мышей CD-1 экспозиция в «Открытом поле» индуцировала снижение специфического связывания [^3H](+)-пентазоцина в P2 фракции. Нельзя исключить, что установленное падение опосредовано снижением количества рецепторов в результате гибели нейронов, при активации в условиях ЭПР стресса проапоптотических сигнальных каскадов (Nguyen L., et al. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2015. V. 127(1). P. 17-29), а с другой стороны, что более вероятно, может являться результатом конкурентного взаимодействия [^3H](+)-пентазоцина с эндогенными лигандами Sigma1R (Urani A., et al. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2001. V. 298(3). P. 1269-1279). Поскольку, известно, что их синтез и секреция, в частности прегненолона, прогестерона и DHEA в условиях стресса значимо возрастают (Purdy R.H., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88(10). P. 4553–4557; Higashi T, Takido N., Shimada K. *Steroids*. 2005. 70. P. 1-11; Lennartsson A.K. Effects of Psychosocial Stress on DHEA and DHEA-S levels. *Acute and Long-term effects: monograph*. Ineko A.B. 2013. 50 p.).

Установленные межлинейные различия у инбредных животных позволяют заключить, что разные реакции на стресс обуславливают неодинаковое перераспределение Sigma1R.

Внутрибрюшинная инъекция афобазола, как и инъекция контрольного раствора индуцировала увеличение специфического связывания [^3H](+)-пентазоцина в P2 и P3 фракциях гомогенатов головного мозга мышей линий CD-1 ($p < 0,0001$ t тест для P2 и P3 фракций) и BALB/c ($p < 0,0001$, $p < 0,005$ t тест для P2 и P3 фракций) в сравнении с интактными животными и не приводила к достоверно значимым изменениям у мышей

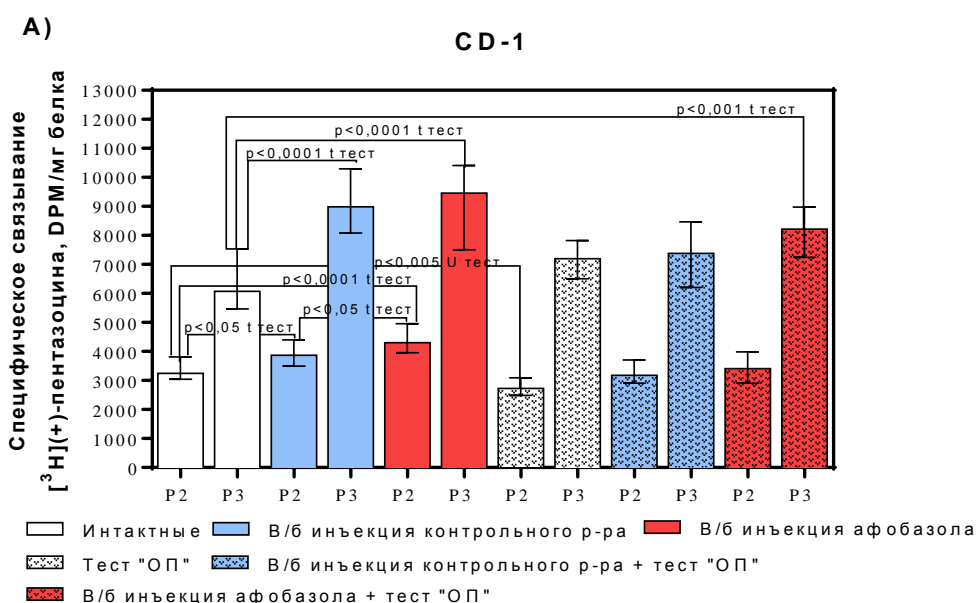
C57BL/6 ($p=0,34$, $p=0,33$ t тест для P2 и P3 фракций). При этом, у мышей CD-1 афобазол вызывал большее увеличение специфического связывания в P2 фракции ($p<0,0001$ t тест) чем внутрибрюшинная инъекция контрольного раствора ($p<0,05$ t тест) при сравнении с интактными животными, а в P3 фракциях в обеих группах достоверные различия с интактными животными составили $p<0,0001$ (t тест) и не различались между собой. У животных BALB/c инъекции контрольного раствора и афобазола сходно увеличивали связывание лиганда в P2 и P3 фракциях в сравнении с интактными животными.

Выраженный результат, свидетельствующий о влиянии афобазола на связывание Sigma1R с лигандом, получен на линии животных CD-1, у которых уровень рецепции в P2 фракции на фоне афобазола был выше, чем при контрольной инъекции ($p<0,05$ t тест).

В условиях экспозиции в «Открытом поле» ни контрольный раствор, ни афобазол ($p=0,34$, $p=0,42$ t тест для P2 и P3 фракций соответственно) не вызывали дополнительных изменений специфического связывания [^3H](+)-пентазоцина в обеих мембранных фракциях головного мозга мышей линии BALB/c по сравнению с интактными животными, и индуцировали увеличение лиганд-рецепторного связывания в P2 и P3 фракциях мышей C57BL/6. При этом, достоверно значимые различия были больше после внутрибрюшинного введения афобазола ($p<0,001$, $p<0,005$ t тест для P2 и P3 фракций соответственно), чем после внутрибрюшинной инъекции контрольного раствора ($p<0,01$, $p<0,05$ t тест для P2 и P3 фракций соответственно). У мышей линии CD-1 афобазол индуцировал увеличение специфического связывания только в P3 фракции ($p=0,86$ и $p<0,001$ t тест для P2 и P3 фракций) в сравнении с интактными животными. В результате внутрибрюшинной инъекции контрольного раствора в аналогичных условиях отмечалась лишь тенденция увеличения специфического связывания в P3 фракции ($p=0,06$ t тест).

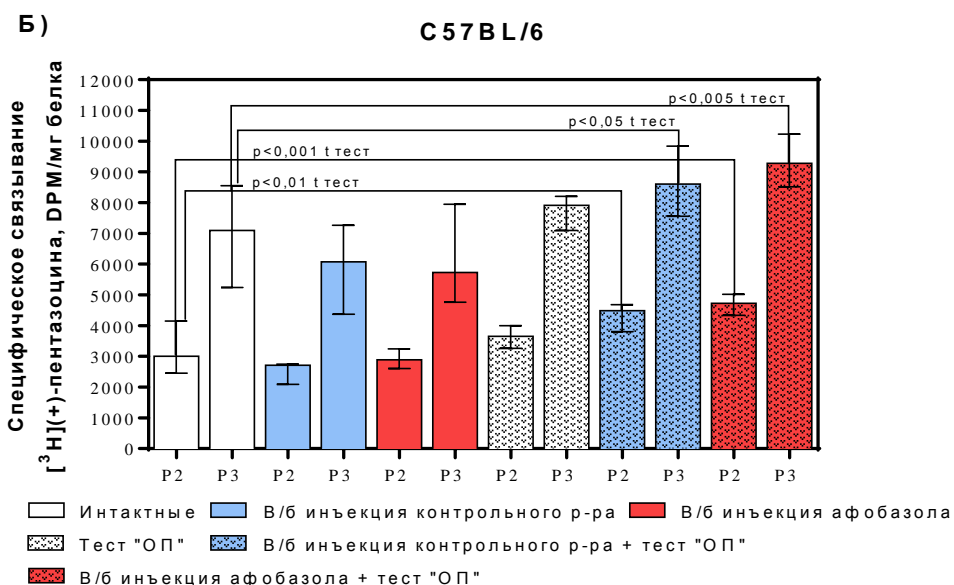
Таким образом, полученные результаты демонстрируют избирательное действие афобазола, которое в большинстве случаев заключается в потенцировании эффекта эмоционально-стрессовых воздействий, дополнительном стимулировании специфического связывания [^3H](+)-пентазоцина. Установленные факты увеличения рецепции [^3H](+)-пентазоцина в P2 фракциях соответствуют данным научной периодики и подтверждают феномен транслокации Sigma1R в область цитоплазматических мембран (Hayashi T., Su T. P. Cell. 2007. V. 131(3). P. 596-610; Hayashi T., Su T. P. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2003. V. 306(2). P. 726-733), вызванной в том числе и афобазолом (Середенин С. Б. и др. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2009. 7. С. 53-55).

В совокупности полученные экспериментальные данные и литературные сведения позволяют сделать заключение, что афобазол, индуцируя транслокацию рецептора, проявляет свойства агониста по отношению к Sigma1R.



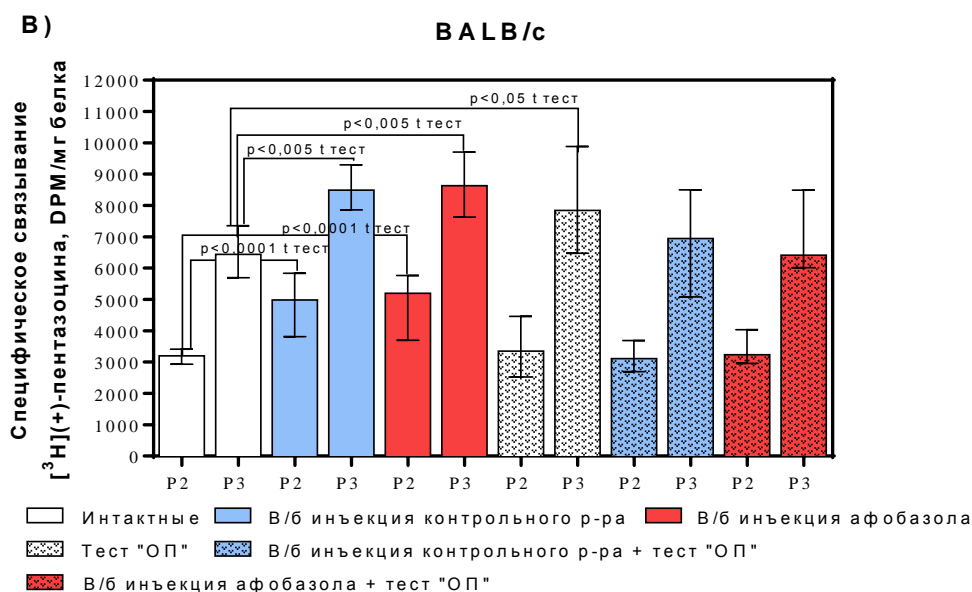
Примечания

- 1 Данные представлены в виде mdn - interquartile range;
- 2 P2, P3 – мембранные фракции гомогенатов головного мозга мышей;
- 3 Количество животных в группах (в соответствии с порядком обозначения групп на графике, слева направо): CD-1=19/20/20/13/15/24.



Примечания

- 1 Данные представлены в виде mdn - interquartile range;
- 2 P2, P3 – мембранные фракции гомогенатов головного мозга мышей;
- 3 Количество животных в группах (в соответствии с порядком обозначения групп на графике, слева направо): C57BL/6=22/8/8/10/8/8.



Примечания

- 1 Данные представлены в виде mdn - interquartile range;
- 2 P2, P3 – мембранные фракции гомогенатов головного мозга мышей;
- 3 Количество животных в группах (в соответствии с порядком обозначения групп на графике, слева направо): BALB/c = 14/11/12/14/15/11.

Рисунок 5 - Специфическое связывание $[^3\text{H}](+)\text{-пентазоцина}$ в P2 и P3 фракциях головного мозга мышей линий CD-1, C57BL/6 и BALB/c при эмоционально-стрессовых воздействиях и введении афобазола

Влияние афобазола *in vitro* на внутриклеточную локализацию липидных рафтов и Sigma1R в живых астроцитах человека

Исходя из данных научной периодики о локализации Sigma1R в области ЭПР в составе липидных микродоменов, содержащих нейтральные липиды и холестерин, способности к транслокации в область цитоплазматической и ядерной мембран под влиянием агонистов, сопряженности гиперэкспрессии Sigma1R с увеличением содержания холестерина и синтеза гликофинголипидов GD1a в липидных рафтах цитоплазматической мембраны (Hayashi T., Su T. P. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2003. V. 306(2). P. 726-733; Hayashi, T., Su T. P. *Life Science Journal*. 2005. V. 77(14). P. 1612-24; Hayashi, T., Su T. P. *Subcellular Biochemistry*. 2010. 51. P. 381-98), мы предполагаем, что Sigma1R может опосредовать формирование и реконструкцию липидных рафтов цитоплазматической мембраны, таким образом, в целом, способствуя ремоделированию последней.

Поэтому в данной работе изучено влияние афобазола на локализацию липидных рафтов и Sigma1R в живых астроцитах человека.

Качественно установлено, что афобазол в концентрации 10^{-5} моль/л через 30 и 60 минут после внесения в ростовую среду индуцирует усиление флюоресценции красителя, ассоциированного с липидными рафтами, в области ядерной и цитоплазматической мембран в сравнении с контрольными данными (рисунок 6).

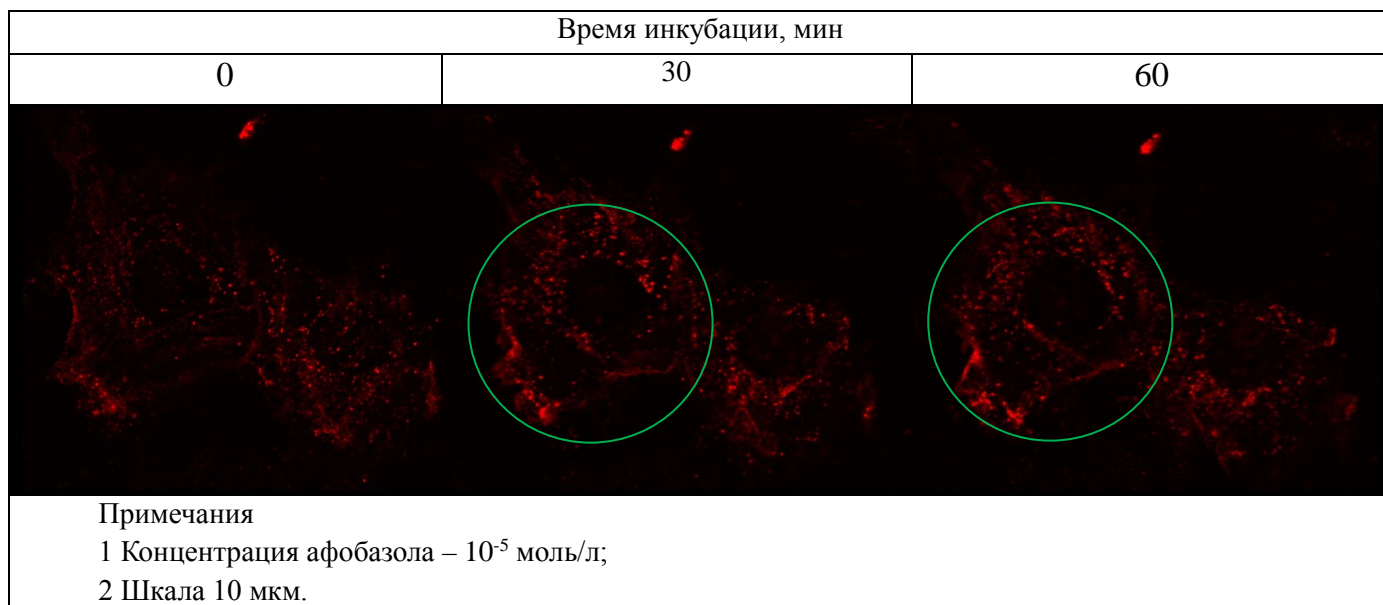


Рисунок 6 - Влияние афобазола *in vitro* на внутриклеточное распределение липидных рафтов в живых астроцитах человека

При этом с использованием специфических флюоресцентных красителей установлена колокализация Sigma1R с липидными рафтами (рисунок 7).

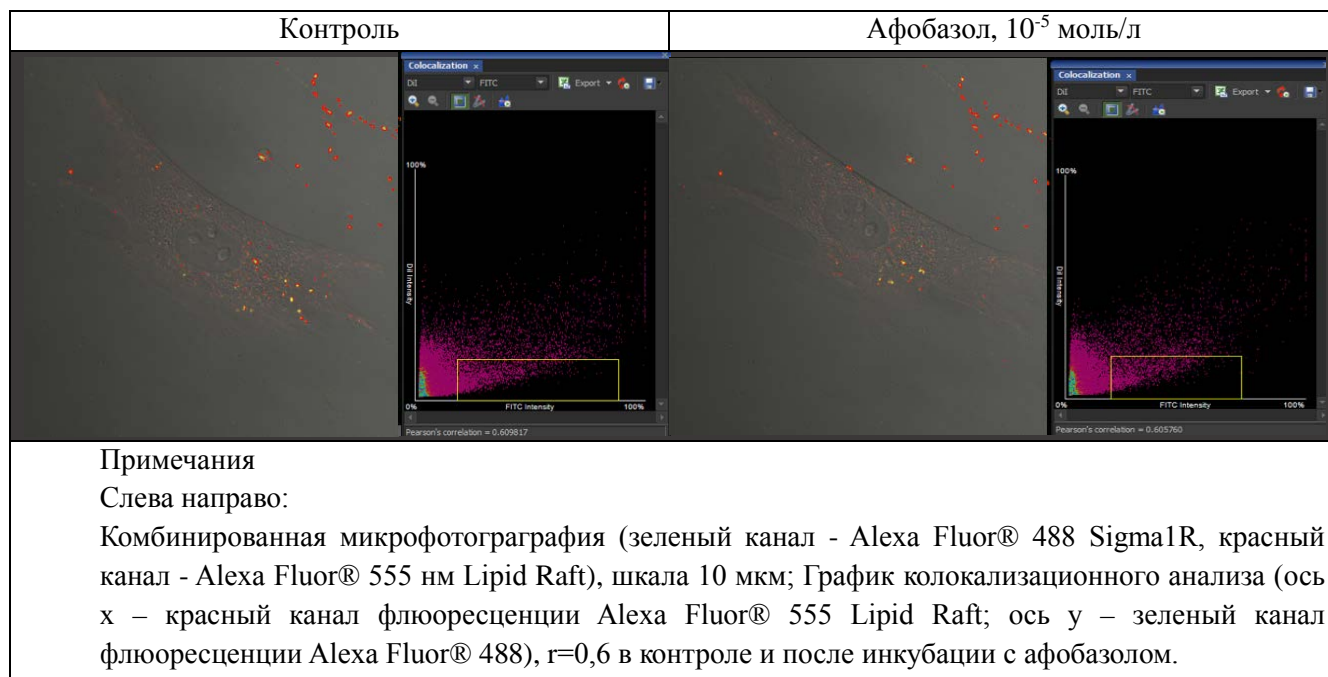


Рисунок 7 - Колокализационный анализ Sigma1R и липидных рафтов в живых астроцитах человека

Установленное усиление интенсивности флюоресценции красителя в области цитоплазматической и ядерной мембран, свидетельствующее об увеличении количества липидных рафтов, и их колокализация с Sigma1R могут быть интерпретированы в связи с радиолигандными данными о транслокации Sigma1R в P2 фракции при введении афобазола, как опосредованное Sigma1R влияние афобазола на формирование липидных рафтов.

Таким образом, совокупность полученных экспериментальных данных открывает перспективу фармакологической регуляции лигандами Sigma1R структуры, свойств и функций липидных рафтов.

Представленные в настоящем подразделе эксперименты выполнены в ГБОУ ВПО РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России на кафедре медицинских нанобиотехнологий при консультативном руководстве академика РАН Чехонина В.П. и участии аспирантов Мельникова П.А. и Габашвили А.Н.

ВЫВОДЫ

1. Радиолигандным методом при сравнении аффинности афобазола к Sigma1R с экзогенными лигандами 3-PPP, PRE-084, декстрометорфаном, BD-1047, галоперидолом и эндогенным лигандом прогестероном установлены близкие значения IC_{50} для афобазола ($2,7 \cdot 10^{-5}$ моль/л) и прогестерона ($9,02 \cdot 10^{-6}$ моль/л).
2. Определен низкий уровень аффинности к Sigma1R основного метаболита афобазола 2-[2-(3-оксоморфолин-4-ил)этилтио]-5-этоксibenзимидазола гидрохлорида, M-11, ($IC_{50} > 5 \cdot 10^{-4}$ моль/л), что исключает зависимость фармакологических эффектов соединения от взаимодействия с Sigma1R.
3. Установлены сходные показатели аффинности афобазола к Sigma1R в P2 фракциях гомогенатов головного мозга интактных мышей CD-1, BALB/c и C57BL/6 при конкурентном взаимодействии с [3H](+)-пентазоцином.
4. При радиолигандном анализе с [G - 3H]PRE-084 у мышей BALB/c выявлена большая аффинность ($IC_{50}Ni=7,36 \cdot 10^{-7}$ моль/л) по сравнению с C57BL/6 ($IC_{50}Ni=3,01 \cdot 10^{-6}$ моль/л). Взаимодействие с [3H](+)-пентазоцином у мышей линий BALB/c, C57BL/6 и аутбредных CD-1, с [G - 3H]PRE-084 у C57BL/6 описывается моделью с одним сайтом связывания, а при использовании радиолиганда [G - 3H]PRE-084 у CD-1 и BALB/c – с двумя сайтами связывания.
5. Специфическое связывание [3H](+)-пентазоцина в P3 фракциях гомогенатов головного мозга интактных мышей выше, чем в P2 фракциях и не имеет различий у инбредных животных C57BL/6, BALB/c и аутбредных CD-1.

6. Установлены различные изменения рецепции [³H](+)-пентазоцина в P2 и P3 фракциях гомогенатов головного мозга инбредных мышей C57BL/6 и BALB/c с разным фенотипом ответа на эмоциональный стресс и у аутбредных мышей CD-1, вызванные эмоционально-стрессовыми воздействиями и введением афобазола в дозе 5 мг/кг.
7. Афобазол в анксиолитической дозе, введенный интактным животным, и в условиях эмоционального стресса, способен увеличивать рецепцию [³H](+)-пентазоцина в P2 фракции, что свидетельствует об индукции транслокации Sigma1R в область цитоплазматической мембраны и обосновывает заключение об агонистических свойствах афобазола по отношению к Sigma1R.
8. Методом иммунофлюоресценции в живых астроцитах человека установлена колокализация Sigma1R с липидными рафтами, не изменяющаяся в условиях инкубации с афобазолом в концентрации 10⁻⁵ моль/л в течение часа.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

На основании полученных в диссертационном исследовании экспериментальных данных и сформулированных на их основе выводов рекомендуется:

1. Дальнейшее изучение афобазола в качестве цито- и нейропротектора на моделях нейродегенеративных заболеваний, при моделировании воздействий средовыми факторами, способными вызвать ЭПР стресс.
2. Дальнейшее изучение параметров взаимодействия афобазола и эндогенных лигандов с Sigma1R для определения клинико-фармакологических показателей рационального применения анксиолитика.
3. Использование сочетания афобазол – М-11, соединения 2-[2-(3-оксоморфолин-4-ил)этилтио]-5-этоксибензимидазола гидрохлорид, основного метаболита афобазола, для анализа зависимости эффектов афобазола от Sigma1R.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. **Ряскина (Абрамова), Е.В.** Взаимодействие производных 2-меркаптобензимидазола с $\sigma 1$ рецепторами [Текст] / **Е.В. Ряскина (Абрамова), М.В. Воронин, С.Б. Середенин** // Химико-фармацевтический журнал. – 2012. – Т. 46, № 6. – С. 12-13.
2. **Абрамова, Е.В.** Взаимодействие афобазола с сигма-1 рецепторами головного мозга мышей [Текст] / **Е.В. Абрамова, М.В. Воронин, С.Б. Середенин** // Химико-фармацевтический журнал. – 2015. – Т. 49, № 1. – С. 9-11.

3. **Абрамова, Е.В.** Радиолигандный анализ σ_1 рецепторов в P2 и P3 фракциях головного мозга мышей в условиях эмоционального стресса и при введении афобазола [Текст] / **Е.В. Абрамова**, М.В. Воронин, С.Б. Середенин // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2017. – Т. 80, № 2. – С. 45-49.

Тезисы:

1. **Ryaskina (Abramova), E.V.** The investigation of 2-mercaptobenzimidazole derivatives interaction with sigma-1 receptors in mice [Text] / **E.V. Ryaskina (Abramova)**, M.V. Voronin, S.B. Seredenin / Abstracts from the 28th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology, 3–7 June, 2012. Stockholm. Sweden. // The International Journal of Neuropsychopharmacology. – 2012. – V. 15, suppl.1. P. 231.
2. **Ряскина (Абрамова), Е.В.** Изучение взаимодействия афобазола и его основного метаболита с sigma-1 рецепторами [Текст] / **Е.В. Ряскина** // Материалы IV съезда фармакологов России «Инновации в современной фармакологии», 18-21 сентября, 2012. Казань, Россия. – М., 2012. - С. 161.
3. **Ryaskina (Abramova), E.V.** Comparative studies of novel 2-mercaptobenzimidazole derivatives neuroreceptor mechanism of action [Электронный ресурс] / **E.V. Ryaskina (Abramova)**, M.V. Voronin // Abstract from the 42th Annual Meeting Society for Neuroscience (13-17 October). 2012. New Orleans, LA, USA. - Online program № 359.02/Y8. <http://www.abstractsonline.com/Plan/ViewAbstract.aspx?sKey=925398b0-8172-47ad-800e-314493ca71e7&cKey=24609e69-4f4f-4b9e-8bf4-0c079cfbfca3&mKey=70007181-01c9-4de9-a0a2-eebfa14cd9f1>.
4. **Ряскина (Абрамова), Е.В.** Анализ взаимодействия sigma-1 рецепторов с лигандами различных химических групп in vitro [Текст] / **Е.В. Ряскина (Абрамова)** // Проблемы разработки новых лекарственных средств: Материалы первой всероссийской научно-практической конференции молодых ученых (3-5 июня, 2013). Москва. – М., 2013. – С. 107.
5. **Ryaskina (Abramova), E.V.** Afobazole increases binding of sigma-1 receptor selective agonist in P2 fraction of CD-1 mice brain homogenate ex vivo [Text] / **E.V. Ryaskina (Abramova)**, M.V. Voronin, S.B. Seredenin / Abstracts from the 29th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology (22–26 June, 2014, Vancouver, Canada). // The International Journal of Neuropsychopharmacology. – 2014. -V. 17, suppl. 1. – P. 91.
6. **Абрамова, Е.В.** Влияние афобазола на связывание σ_1 рецепторов с прототипными агонистами в P2 и P3 фракциях гомогенатов головного мозга мышей [Текст] / **Е.В. Абрамова** // Достижения современной фармакологической

науки: Материалы Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием (22-23 октября, 2015). – Рязань, 2015. – С. 15-18.

7. **Абрамова, Е.В.** Внутриклеточные эффекты активации σ_1 рецепторов афобазолом [Текст] / **Е.В. Абрамова** // Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам: Материалы 6-ой Международной конференции, 9-13 ноября, 2015. Клязьма // Экспериментальная и клиническая фармакология. – Т. 78, приложение. – М.: изд-во Фолиум, 2015. – С. 5.
8. **Abramova, E.V.** Interaction of afobazole with Sigmar1 in mice brains [Text] / **E.V. Abramova** // BIT's 14th Annual Congress of International Drug Discovery Science and Technology, 16-18 June, 2016. Gyeonggi, South Korea. // Conference abstract book. – Dalian, China, 2016. – P. 74.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИФЗР - инозитол 1,4,5-трифосфатные рецепторы;

M-11 – основной метаболит афобазола, соединение 2-[2-(3-оксоморфолин-4-ил)этилтио]-5-этоксibenзимидазола гидрохлорид;

ЭПР – эндоплазматический ретикулум;

ASIC1a (Acid-Sensing Ion Channel) - протон-чувствительный ионный канал;

IC₅₀ – концентрация холодного лиганда, в которой он ингибирует специфическое связывание меченого лиганда на 50%;

IC_{50Hi} - IC₅₀ в области низких концентраций лиганда;

Mdn – interquartile range – медиана (mdn) и интерквартильный диапазон;

Mean±SEM (mean±standard error of mean) – среднее ± стандартная ошибка среднего;

MT₁ (melatonin receptor type 1) - рецептор мелатонина 1^{ого} типа;

MT₃ (melatonin receptor type 3) - рецептор мелатонина 3^{ого} типа;

NMDA рецептор (N-methyl-D-aspartate receptor) - ионотропный рецептор глутамата, селективно связывающий N-метил-D-аспарат;

P1, P2, P3 – ядерная, синаптосомальная, микросомальная мембранные фракции соответственно;

P3H (P3 High density) – P3 фракция высокой плотности;

P3L (P3 Low density) – P3 фракция низкой плотности;

Sigma1R (σ_1) - сигма рецептор 1^{ого} типа;

VRCC (volume-regulated chloride channels) – объем чувствительные хлорные каналы.