

## РАДИОРЕЦЕПТОРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ УЧАСТКОВ СПЕЦИФИЧЕСКОГО СВЯЗЫВАНИЯ [<sup>3</sup>H]-ОЛАНЗАПИНА В ФРОНТАЛЬНОЙ КОРЕ И СТРИАТУМЕ КРЫС

А. А. Зозуля<sup>1</sup>, В. П. Шевченко<sup>2</sup>, Н. В. Кост<sup>1</sup>, И. Ю. Нагаев<sup>2</sup>,  
А. В. Хомякова<sup>1</sup>, Н. Ф. Мясоедов<sup>2</sup>

Проведено прямое радиорецепторное исследование участков специфического связывания атипичного антипсихотического средства оланзапина на мембранах головного мозга крыс. Меченный тритием оланзапин получен методом изотопного обмена. Идентичность [<sup>3</sup>H]-оланзапина исходному подтверждена методом ВЭЖХ и масс-спектрометрически. Анализ Скэтчарда определил наличие в фронтальной коре двух типов участков специфического связывания [<sup>3</sup>H]-оланзапина. Высокоаффинные характеризуются  $K_d = 1,7$  нМ, что соответствует аффинности оланзапина к 5-НТ-2а и гистаминовым рецепторам. Однако, по литературным данным, плотность этих рецепторов в несколько раз ниже таковой, полученной в нашем исследовании ( $B_{max} = 1,4$  пмоль/мг белка), что позволяет высказать предположение о наличии ранее неизвестных участков связывания оланзапина. “Среднеаффинные” места связывания оланзапина в фронтальной коре ( $K_d = 68,5$  нМ и  $B_{max} = 10,8$  пмоль/мг белка), по-видимому, соответствуют дофаминовым, мускариновым и  $\alpha_1$ -адренорецепторам. В стриатуме также продемонстрировано наличие двух типов участков связывания [<sup>3</sup>H]-оланзапина. “Среднеаффинные” участки рецепторного взаимодействия характеризуются  $K_d = 18$  нМ и  $B_{max} = 13$  пмоль/мг белка, что практически соответствует D2-рецепторам, плотность которых в этом отделе мозга доминирует. “Низкоаффинные” участки связывания оланзапина в стриатуме характеризуются  $K_d = 117$  нМ и  $B_{max} = 32,5$  пмоль/мг белка.

**Ключевые слова:** оланзапин, меченный тритием оланзапин, 5-НТ-2-рецепторы, D2-рецепторы, атипичные антипсихотические средства

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для лечения шизофрении и других психозов все большее распространение получают атипичные антипсихотические средства (нейролептики). Их отличиями от типичных нейролептиков (первого поколения) является меньшее количество побочных эффектов, связанных с экстрапирамидными расстройствами, способность снижать негативную симптоматику психозов (асоциальность, снижение работоспособности, обучаемости и др.) [1, 4, 8]. В отличие от типичных нейролептиков, атипичные оказывают свои эффекты, взаимодействуя не только с дофаминовой, но прежде всего с серотониновой и другими нейромедиаторными системами [7, 8, 10].

Одним из распространенных в клинической практике атипичных нейролептиков является оланзапин [4]. Исследования его взаимодействия с рецепторами мозга или рецепторами, клонированными в клеточных культурах, проводили, изучая способность оланзапина вытеснять меченые селективные лиганды серотониновых, дофаминовых и других рецепторов [7, 8, 10, 12]. В одном из исследований изучена способность мече-

ного оланзапина взаимодействовать с этими рецепторами, клонированными в культуре клеток [11]. Однако прямое изучение взаимодействия [<sup>3</sup>H]-оланзапина с рецепторами головного мозга не проводилось. Такие эксперименты могли бы позволить, во-первых, непосредственно определить константы взаимодействия препарата с рецепторами головного мозга, во-вторых, создать тест-систему, необходимую для поиска новых препаратов с фармакологическим профилем атипичных антипсихотиков.

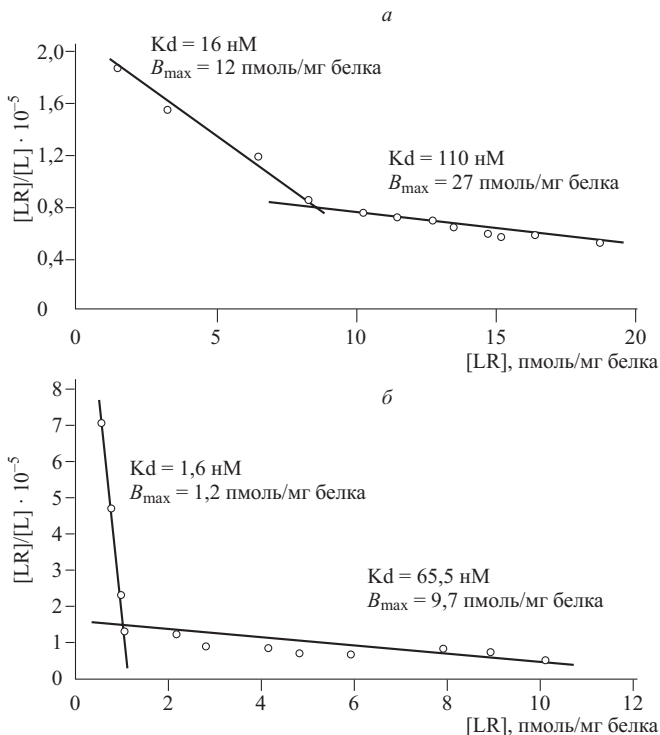
В связи с этим целью настоящего исследования было изучение специфического связывания [<sup>3</sup>H]-оланзапина с мембранной фракцией фронтальной коры и стриатума крыс. Выбор данных участков мозга обусловлен высокой плотностью серотониновых и дофаминовых рецепторов во фронтальной коре и стриатуме соответственно [3].

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для получения [<sup>3</sup>H]-оланзапина, сохраняющего исходные свойства немеченого препарата, был использован метод изотопного обмена. При введении метки в молекулу оланзапина с использованием твердофазного метода [2] максимальное включение трития наблюдалось при 200°C (исследование проводили в температурном диапазоне 150 – 220°C). После очистки меченого оланзапина хроматографическими методами (колоночной хроматографией и ВЭЖХ) радиохимическая чистота составляла 98 – 99 %, выход меченого препарата — 10 %, молярная радиоактивность — 12 Ки/ммоль. Идентичность меченого олан-

<sup>1</sup> Научный Центр психического здоровья РАМН, Москва, 113152, Загородное шоссе, 2. E-mail: azozulya@yandex.ru

<sup>2</sup> Институт молекулярной генетики РАН, Москва, 123182, пл. Курчатова, 2.



Анализ связывания  $[^3\text{H}]$ -оланзапина с мембранной фракцией стриатума (а) и фронтальной коры большого мозга (б) крыс в координатах Скэтчарда.

LR — концентрация специфически связанного и L — несвязавшегося  $[^3\text{H}]$ -оланзапина. Проиллюстрированы результаты одного из четырех независимых экспериментов. Наклон кривой определяли с помощью метода наименьших квадратов.

а) коэффициент корреляции 0,92 и 0,95 для среднеаффинного ( $K_d = 16$  нМ,  $B_{\max} = 12$  пмоль/мг белка) и низкоаффинного ( $K_d = 65,5$  нМ,  $B_{\max} = 9,7$  пмоль/мг белка) связывания соответственно. б) коэффициент корреляции 0,93 и 0,95 для высокоаффинного ( $K_d = 1,6$  нМ,  $B_{\max} = 1,2$  пмоль/мг белка) и среднеаффинного ( $K_d = 65,5$  нМ,  $B_{\max} = 9,7$  пмоль/мг белка) связывания соответственно.

запина исходному оланзапину подтверждена методом ВЭЖХ и масс-спектрометрическим анализом исходного оланзапина и оланзапина после моделирования процедуры введения метки, в которой вместо трития использовали протий. В последнем случае масс-спектры обоих образцов совпадали с расчетной  $[m/z\ 312\ (M^+)]$  [2]. Таким образом, на первом этапе исследования был получен инструмент, позволяющий провести прямое исследование взаимодействия  $[^3\text{H}]$ -оланзапина с рецепторами головного мозга крыс.

В экспериментах использовали 30 беспородных белых крыс-самцов массой около  $200 \pm 20$  г, полученных из питомника РАМН Столбовая. Животных содержали в стандартных условиях по 5 особей в клетках МАС 4 при температуре  $20^\circ\text{C}$ , световом режиме 12:12 (свет с 8.00 до 20.00), питьевом и пищевом режиме *ad libitum*. Крыс декапитировали. Все операции по выделению стриатума и фронтальной коры проводили на холоду.

Используемые отделы мозга гомогенизировали в ледяном 50 мМ трис-НСI буфере рН 7,4 (соотношение вес/объем = 1/20) в механическом гомогенизаторе типа Potteg (стекло/тефлон). Гомогенат центрифугировали (3000 g, 30 мин,  $4^\circ\text{C}$ ). Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в том же объеме ледяного 50 мМ трис-НСI буфера рН 7,4. Вышеописанную процедуру повторяли три раза. Перед последним центрифугированием гомогенат инкубировали 10 мин при  $37^\circ\text{C}$ . Полученный осадок замораживали и хранили при  $-70^\circ\text{C}$ .

При проведении радиорецепторного анализа использовали плоскостонные платы "Linbro" (Великобритания), которые, как

было показано в контрольных экспериментах, не сорбируют  $[^3\text{H}]$ -оланзапин. Все растворы готовили на 50 мМ трис-НСI буфере рН 7,4 ( $20^\circ\text{C}$ ). Инкубационная смесь объемом 300 мкл содержала  $[^3\text{H}]$ -оланзапин (0,5 – 150 нМ, молярная радиоактивность — 13 МКи/ммоль), мембранную фракцию головного мозга крыс — 0,2 – 0,6 мг белка/мл, 0,1 мг/мл аскорбиновой кислоты. Величину специфического связывания определяли по разнице связывания  $[^3\text{H}]$ -оланзапина в отсутствие (общее связывание) и присутствии (неспецифическое связывание) избытка (300 нМ) немеченого оланзапина. Она составляла в среднем 60 – 70 % от общей величины связывания. Инкубацию проводили в течение 40 мин при температуре  $20^\circ\text{C}$  при постоянном перемешивании. Связавшуюся метку отделяли от несвязавшейся путем фильтрации под вакуумом на стекловолоконистых фильтрах GF/B "Whatman" (Великобритания), используя клеточный харвестер "Skatron" (Норвегия). При этом лунки промывали 6 мл охлажденного 50 мМ трис-НСI буфера рН 7,4 ( $4^\circ\text{C}$ ) в течение 15 с. Уровень радиоактивности определяли на жидкостно-сцинтилляционном счетчике MiniBeta ("LKB-Wallak", Финляндия). Определение белка в пробах проводили по методу М. М. Bradford с использованием наборов фирмы "Sigma" (США). Калибровочную кривую строили по бычьему сывороточному альбумину.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Радиорецепторное исследование кинетики специфического связывания  $[^3\text{H}]$ -оланзапина с мембранами фронтальной коры и стриатума продемонстрировало, что наступление равновесия при  $20^\circ\text{C}$  наблюдается за 15 мин инкубации.

Анализ кривой насыщения специфического связывания  $[^3\text{H}]$ -оланзапина в стриатуме в координатах Скэтчарда продемонстрировал наличие, как минимум, двух типов рецепторов. "Среднеаффинные" участки рецепторного взаимодействия характеризуются равновесной константой диссоциации, равной  $18 \pm 3$  нМ, "низкоаффинные" —  $117 \pm 8$  нМ. Концентрация "среднеаффинных" и "низкоаффинных" участков связывания в стриатуме равна  $13 \pm 1,5$  и  $32,5 \pm 6,2$  пмоль/мг белка соответственно (рисунок, а).

Анализ кривой насыщения специфического связывания  $[^3\text{H}]$ -оланзапина в фронтальной коре в координатах Скэтчарда также продемонстрировал наличие, как минимум, двух типов рецепторов. "Высокоаффинные" участки рецепторного взаимодействия характеризуются равновесной константой диссоциации, равной  $1,7 \pm 0,5$  нМ, "среднеаффинные" —  $68,5 \pm 4,1$  нМ. Концентрация "высоко" — и "среднеаффинных" участков связывания в фронтальной коре равна  $1,4 \pm 0,6$  и  $10,8 \pm 1,1$  пмоль/мг белка соответственно (рисунок, б).

Известно, что оланзапин способен вытеснить селективные меченые лиганды из ряда рецепторов головного мозга. По аффинности эти рецепторы можно условно разделить на три группы: "высокоаффинные" ( $K_d < 10$  нМ) — гистаминовые H1, серотониновые 5-НТ-2а и 5-НТ-2с; "среднеаффинные" ( $10$  нМ  $< K_d < 100$  нМ) — дофаминовые D2, м-холинорецепторы,  $\alpha_1$ -адренорецепторы; "низкоаффинные" ( $K_d > 100$  нМ) — серотониновые 5-НТ-1а, 5-НТ-1д и  $\alpha_2$ -адренорецепторы [8 – 10].

Участки специфического связывания [ $^3\text{H}$ ]-оланзапина с мембранами стриатума, характеризующиеся “средней” аффинностью (18 нМ), рисунок, а, могут включать дофаминовые D<sub>2</sub>-рецепторы, плотность которых в стриатуме высока относительно других отделов мозга [3], а также м-холино- и  $\alpha_1$ -адренорецепторы. Это следует из близости значений величин К<sub>д</sub> этих рецепторов (20, 36 и 44 нМ) по литературным данным [8] и полученным в настоящем исследовании результатам (рисунок, а).

Можно предполагать, что “высокоаффинные” участки специфического связывания [ $^3\text{H}$ ]-оланзапина в фронтальной коре (К<sub>д</sub> = 1,7), рисунок, б, по крайней мере частично, являются 5-HT-2а и гистаминовыми H<sub>1</sub>-рецепторами. Концентрация “высокоаффинных” участков связывания оланзапина в фронтальной коре составляет около 1,4 пмоль/мг белка (рисунок, б). Однако, по литературным данным, плотность серотониновых рецепторов в этой области мозга в несколько раз ниже [5, 9], а гистаминовых — на два порядка меньше [6]. Можно предполагать, что в фронтальной коре существуют неизвестные до настоящего времени участки высокоаффинного специфического связывания оланзапина, значение которых в осуществлении фармакологических эффектов препарата пока неясно. “Среднеаффинные” места специфического связывания [ $^3\text{H}$ ]-оланзапина (К<sub>д</sub> = 68 нМ), рисунок, б, могут являться дофаминовыми, мускариновыми и  $\alpha_1$ -адренорецепторами.

## ВЫВОД

Анализ кривой насыщения специфического связывания [ $^3\text{H}$ ]-оланзапина с мембранами стриатума крыс в координатах Скэтчарда продемонстрировал наличие двух участков связывания: “среднеаффинных”(равно-

весная константа диссоциации  $18 \pm 3$  нМ, плотность рецепторов  $13,0 \pm 1,5$  пмоль/мг белка) и “низкоаффинных” ( $117 \pm 8$  нМ,  $32,5 \pm 6,2$  пмоль/мг белка). В фронтальной коре обнаружены “высокоаффинные” ( $1,7 \pm 0,5$  нМ,  $1,4 \pm 0,6$  пмоль/мг белка) и “среднеаффинные” — ( $68,5 \pm 4,1$  нМ,  $10,8 \pm 1,1$  пмоль/мг белка) участки специфического связывания.

Работа выполнена при поддержке программы исследований Президиума РАН “Фундаментальные науки — медицине”, грантов Научные школы № НШ-5638.2006.4 (руководитель акад. Н. Ф. Мясоедов) и РФФИ офи 06-04-08257 (руководитель проф. А. А. Зозуля).

## ЛИТЕРАТУРА

1. К. С. Раевский, *Психиатрия и психофармакотерапия*, № 2, 132 – 134 (2000).
2. В. П. Шевченко, И. Ю. Нагаев, Ю. В. Кузнецов и др., *Биоорганическая химия*, **31**(4), 378 – 383 (2005).
3. S. Chalon, S. Delion-Vancassel, C. Belzung, et al., *The Journal of Nutrition.*, **128**(12), 2512 – 2519 (1998).
4. I. R. De Oliveira and M. F. Juruena, *J. Clin. Pharm. Ther.*, **31**(6), 523 – 34 (2006).
5. V. Klimek, J. Zak-Knapic, and M. Mackowiak, *J. Psychiatry Neurosci.*, **19**(1), 63 – 67 (1994).
6. V. Lozeva, L. Tuomisto, D. Sola, et al., *R. Hepatology*, **33**(6), 1370 – 1376 (2001).
7. H. Y. Meltzer, Z. Li, Y. Kaneda, and J. Ichkawa, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.*, **27**(7), 1159 – 1172 (2003).
8. E. Richelson and T. Souder, *Life Sci.*, **68**(4), 29 – 39 (2000).
9. M. Rinaldi-Carmona, C. Congy, P. Pointeau, et al., *Life Sci.*, **54**(2), 119 – 127 (1994).
10. G. P. Reynolds, *J. Psychopharmacol.*, **18**(3), 340 – 345 (2004).
11. P. Seeman, *Can. J. Psychiatry*, **47**(1), 27 – 38 (2002).
12. J. Y. Zhang, D. M. Kowal, S. P. Nawoschik, et al., *Biochem. Pharmacol.*, **71**(4), 521 – 9 (2006).

Поступила 09.03.07

## RADIORECEPTOR STUDY OF [ $^3\text{H}$ ]-OLANZAPINE SPECIFIC BINDING SITES IN RAT FRONTAL CORTEX AND STRIATUM

A. A. Zozulya<sup>1</sup>, V. P. Shevchenko<sup>2</sup>, N. V. Kost<sup>1</sup>, I. Yu. Nagaev<sup>2</sup>, A. V. Khomyakova<sup>1</sup>, and N. F. Myasoedov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> State Research Center for Mental Health, Russian Academy of Medical Sciences, Zagorodnoe sh. 2/2, Moscow, 113152 Russia

<sup>2</sup> Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, pl. Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia

e-mail: zozulya@yandex.ru

The direct radioreceptor assay was used to elucidate the interactions of clinically employed atypical antipsychotic drug olanzapine with the specific binding sites in rat brain membranes. Tritium-labeled olanzapine was obtained by isotope exchange method. HPLC and mass spectrometry assays confirmed the identity of [ $^3\text{H}$ ]-olanzapine to the initial compound. The specific [ $^3\text{H}$ ]-olanzapine binding sites of the two types were identified in frontal cortex by means of the method of Scatchard's plots. High affinity sites showed steady-state dissociation binding constant ( $KD$ ) of 1.7 нМ, which is indicative of olanzapine affinity to 5-HT-2a and histamine receptors. However, according to available literature data, the density of these receptors is several times smaller than that determined in our study (maximum number of binding sites corresponded to  $B_{\max} = 1.4$  pmol/mg protein), thus allowing an assumption about the existence of yet unknown binding sites of the antipsychotic drug under consideration. Moderate affinity binding sites of olanzapine in frontal cortex ( $KD = 68.5$  нМ,  $B_{\max} = 10.8$  pmol/mg protein) apparently correspond to dopamine, muscarinic, and alpha-1-adrenoceptors. [ $^3\text{H}$ ]olanzapine binding sites of the two types were also determined in striatum. The moderate-affinity sites of the receptor interaction had  $KD = 18.0$  нМ and  $B_{\max} = 13.0$  pmol/mg protein. These values in fact correspond to D<sub>2</sub> receptors, whose density prevails in this cortical region. The low-affinity binding sites of olanzapine in striatum had  $KD = 117.0$  нМ and  $B_{\max} = 32.5$  pmol/mg protein.