

Метаболит афобазола М-11 ингибирует хинон-редуктазу-2

Кадников И.А., Воронин М.В., Середенин С.Б.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Резюме. *Актуальность.* Ингибирование хинон-редуктазы-2 (NQO2) является перспективным для достижения нейропротекторного действия. Анксиолитик афобазол (5-этокси-2-[2-(морфолино)-этилтио] бензимидазола дигидрохлорид) и его метаболит М-11 (2-[2-(3-оксоморфолин-4-ил)-этилтио]-5-этоксибензимидазола гидрохлорид) взаимодействуют с регуляторным мелатонин-зависимым сайтом NQO2. Ранее нами показано, что афобазол ингибирует фермент. Влияние М-11 на NQO2 не изучено. *Цель.* Изучить действие метаболита афобазола М-11 на активность NQO2. *Методы.* Влияние М-11 на активность человеческого рекомбинантного фермента хинон-редуктаза-2 (hNQO2) исследовали методом флуоресцентной спектроскопии. *Результаты.* Установлено, что М-11 ингибирует hNQO2 в концентрациях 0,5 и 1,0 мМ, снижая скорость реакции на 12 и 24 % соответственно. В этих же концентрациях соединение М-11 уступает действию афобазола. *Заключение.* Соединение М-11 ингибирует NQO2 и может использоваться для изучения фармакологических эффектов афобазола, обусловленных взаимодействием с регуляторным сайтом фермента.

Ключевые слова: метаболит афобазола; хинон-редуктаза-2; МТ3-рецептор

Для цитирования:

Кадников И.А., Воронин М.В., Середенин С.Б. Метаболит афобазола М-11 ингибирует хинон-редуктазу-2 // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2018. – №3. – С.27–30. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10020.

Afobazole metabolite M-11 inhibits quinone reductase 2

Kadnikov I.A., Voronin M.V., Seredenin S.B.

FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Resume. *Objective.* Inhibition of quinone reductase 2 (NQO2) is a perspective target to achieve neuroprotective effect. Anxiolytic drug afobazole (5-Ethoxy-2-[2-(morpholino)-ethylthio]benzimidazole dihydrochloride) and its main metabolite M-11 (2-[2-(3-oxomorpholin-4-yl)-ethylthio]-5-ethoxybenzimidazole hydrochloride) can interact with melatonin dependent regulatory site of NQO2. Previously we have figured that afobazole inhibits NQO2. However, the role of interaction between M-11 and NQO2 is unclear. *Aim.* To study the effect of M-11 on activity of NQO2. *Methods.* The influence of M-11 on activity of human recombinant NQO2 (hNQO2) was measured utilizing fluorescent spectroscopy. *Results.* M-11 inhibits hNQO2 in concentrations of 0.5 and 1.0 mM, decreasing enzymatic reaction velocity on 12 and 24 % respectively. In same concentrations, M-11 is inferior to afobazole. *Conclusion.* Compound M-11 inhibits NQO2 and can be used to study pharmacological effects of afobazole caused by interaction with regulatory site of enzyme.

Keywords: afobazole metabolite; NQO2; МТ3 receptor

For citations:

Kadnikov IA, Voronin MV, Seredenin SB. Afobazole metabolite M-11 inhibits quinone reductase 2. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2018;3:27–30. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2018-10020.

Введение

Фермент NQO2 является цитозольным флавопротеином [1], катализирующим двухэлектронное восстановление пара- и орто-хинонов. Субстратной специфичностью к NQO2 обладают эндогенные и экзогенные хиноны, такие как производные катехоламинов и менадион (витамин К₃) [2, 3]. У человека фермент экспрессируется в скелетных мышцах, почках, печени, лёгких, сердце, отделах головного мозга [4, 5]. Установлено, что NQO2 имеет мелатонин-зависимый регуляторный сайт (МТ₃ рецептор) [6], а мелатонин ингибирует фермент [7]. Известно, что катализируемое NQO2 восстановление хинонов ведёт к образованию свободно-радикальных продуктов [8], а повышенная

экспрессия фермента коррелирует с развитием болезни Альцгеймера [9] и идиопатической формы болезни Паркинсона [10]. В фармакологических экспериментах показано, что ингибирование NQO2 опосредует нейропротекторное влияние и стимулирует когнитивные функции [11, 12].

В предыдущих опытах установлено, что анксиолитик афобазол (5-этокси-2-[2-(морфолино)-этилтио] бензимидазола дигидрохлорид) и его основной метаболит М-11 (2-[2-(3-оксоморфолин-4-ил)-этилтио]-5-этоксибензимидазола гидрохлорид) обладают лигандными свойствами к МТ₃-рецептору с IC₅₀ = 9,9*10⁻⁷ и 4,0*10⁻⁷ М соответственно [13]. Выявлено, что афобазол обладает ингибирующим действием на NQO2,

которое реализуется по смешанному типу, а значения K_i афобазола и мелатонина сопоставимы [14]. Взаимодействие М-11 с MT_3 рецептором позволяет предположить наличие у данного соединения ингибирующей активности по отношению к NQO2. Поэтому целью данного этапа исследований стало *in vitro* изучение влияния М-11 на активность рекомбинантного NQO2 человека в сравнении с афобазолом.

Материалы и методы

Химические реактивы

Сульфат аммония, 2-метилнафтален-1,4-дион (менадион), метанол, рекомбинантный фермент хинон-редуктаза-2 человека (hNQO2), 1xPBS (Sigma-Aldrich, США, Сент-Луис), 1-бензил-1,4-дигидроникотинамид (BNAH) (US Biological, США, Салем), 5-этокси-2-[2-(морфолино)-этилтио] бензимидазола дигидрохлорид (афобазол) и его основной метаболит 2-[2-(3-оксоморфолин-4-ил)-этилтио]-5-этоксibenзимидазола гидрохлорид (М-11) (синтезированы в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»).

Определение скорости реакции катализируемой NQO2

Влияние М-11 на активность NQO2 изучали в диапазоне конечных концентраций 0,1–1,0 мМ методом флуоресцентной спектроскопии на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (США, Санта-Клара). В качестве субстрата NQO2 использовали менадион в конечной концентрации 1,0 мМ. Флуоресцирующим агентом служил косубстрат фермента BNAH в конечной концентрации 0,75 мМ. Как препарат сравнения использовали афобазол в тех же конечных концентрациях, что и М-11 (0,1–1,0 мМ). Матричные растворы менадиона (30 мМ) и BNAH (22,5 мМ) готовили в метаноле и хранили при -20°C . Матричные растворы М-11 (30 мМ) и афобазола (30 мМ) готовили в 1xPBS и хранили при 4°C . Матричный раствор NQO2 (635 U) готовили в 2,78 М растворе сульфата аммония (1 мг NQO2/1 мл $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) и хранили при температуре -20°C . Раствор NQO2 для ферментативной реакции готовили путём доведения 2,8 мкл матричного раствора до 100 мкл 2,78 М сульфатом аммония. Все рабочие растворы готовили в день эксперимента.

Ферментативную реакцию проводили в кювете для флуоресценции объёмом 100 мкл (длина оптического пути 1 см). Инкубационная среда содержала по 2 мкл матричных растворов менадиона, BNAH, афобазола или М-11 и 52 мкл 1xPBS. Реакцию инициировали добавлением в инкубационную среду 2 мкл рекомбинантного NQO2 человека для достижения конечной активности 0,1 U. Скорость реакции изме-

ряли по убыванию флуоресценции BNAH при длине волны возбуждения 370 нм и длине волны испускания 450 нм в условиях постоянной температуры 37°C . Все измерения проводили в 5 повторениях. Скорость ферментативной реакции определяли по убыванию интенсивности флуоресценции BNAH на прямом участке кривой и сопоставлением полученных данных с калибровочными значениями.

Математическая обработка результатов

Полученные экспериментальные данные были нормированы на единицу ферментативной активности. Оценку статистической значимости полученных результатов проводили с применением одностороннего дисперсионного анализа, критерий Холма-Шидака. Данные представлены в виде среднее \pm стандартное отклонение. Для статистической обработки результатов и построения графиков использовали программный пакет GraphPad Prism version 5.02 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

Результаты

В экспериментах показано, что скорость ферментативной реакции составляет $2,96 \pm 0,141$ мМ/мин. Основной метаболит афобазола М-11 снижает активность hNQO2 в концентрациях 0,5 мМ и 1,0 мМ до $2,6 \pm 0,058$ мМ/мин ($p = 0,02$) и $2,26 \pm 0,056$ мМ/мин ($p < 0,001$) соответственно (рис. 1). Установлена зависимость ингибирования hNQO2 от концентрации М-11 в инкубационной среде. А именно, М-11 в концентрации 1,0 мМ статистически значимо снижает активность hNQO2 в сравнении с концентрацией 0,5 мМ ($p = 0,03$) и 0,1 мМ ($p = 0,001$) (рис. 1). М-11 в концентрации 0,1 мМ не оказывает влияния на скорость реакции hNQO2 ($2,86 \pm 0,234$ мМ/мин) в сравнении с контрольными значениями ($p = 0,32$) (рис. 1). М-11 уступает афобазолу в ингибирующем действии на hNQO2. Афобазол в концентрации 0,1 мМ снижает активность фермента до $2,52 \pm 0,094$ мМ/мин ($p = 0,003$) (рис. 1), статистически значимо уменьшая скорость реакции в сравнении с М-11 ($p = 0,01$). В концентрациях 0,5 мМ и 1,0 мМ афобазол снижал активность hNQO2 до $2,29 \pm 0,085$ ($p < 0,001$) и $1,73 \pm 0,122$ мМ/мин ($p < 0,001$), превосходя действие М-11 на 12 % ($p = 0,02$) и 24 % ($p = 0,001$) соответственно (рис. 1). Как и для М-11, для афобазола показана концентрационная зависимость скорости ферментативной реакции hNQO2. Афобазол в концентрации 1,0 мМ обладает большим ингибирующим действием, чем в концентрациях 0,1 мМ ($p < 0,001$) и 0,5 мМ ($p < 0,001$) (рис. 1). Влияние 0,5 мМ афобазола на активность hNQO2 статистически не отличается от его действия в концентрации 0,1 мМ ($p = 0,06$) (рис. 1).

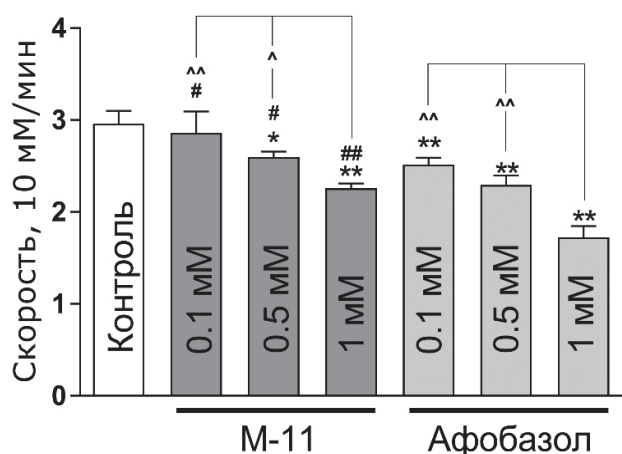


Рис. 1. Влияние афобазола и его основного метаболита М-11 на активность человеческого рекомбинантного фермента NQO2

Примечания: Данные представлены в виде $M \pm S.D.$, $n = 5$. * – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$, ANOVA, Holm-Sidak post-hoc). ** – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,01$, ANOVA, Holm-Sidak post-hoc). # – статистически значимые различия между эффектами афобазола и М-11 в идентичной концентрации ($p < 0,05$, ANOVA, Holm-Sidak post-hoc). ## – статистически значимые различия между эффектами афобазола и М-11 в идентичной концентрации ($p < 0,01$, ANOVA, Holm-Sidak post-hoc). ^ – статистически значимые различия по сравнению с действием соединения в концентрации 1,0 мМ ($p < 0,05$, ANOVA, Holm-Sidak post-hoc). ^^ – статистически значимые различия по сравнению с действием соединения в концентрации 1,0 мМ ($p < 0,01$, ANOVA, Holm-Sidak post-hoc).

Обсуждение

Проведённое исследование подтвердило предположение об ингибирующем влиянии основного метаболита афобазола М-11 на активность hNQO2. Результаты экспериментов согласуются с выявленным ранее ингибированием hNQO2 [14] лигандами MT_3 -рецеп-

торов афобазолом [13] и мелатонином [15] в использованной бесклеточной системе и соответствуют данным научной периодики, полученным для рекомбинантного hNQO2 в других экспериментальных условиях. Так, мелатонин и его производные, проявляющие селективные лигандные свойства к MT_3 рецептору в наномолярном диапазоне [7], ингибировали активность hNQO2 выделенной из клеток линии CHO-K1/hQR2 в микромолярных концентрациях [15]. В экспериментах *in vitro* и *ex vivo* показано ингибирующее действие на фермент других лигандов MT_3 рецептора разных химических групп, а именно флаваноидов ресвератрола [15] и кверцетина [16], производных бензимидазола ТВВ, ТВВz и DMAT [17].

В нашей работе показано, что М-11 уступает в ингибирующей активности hNQO2 афобазолу. Из научной периодики известно, что вещества с более высоким сродством к MT_3 рецептору могут слабее ингибировать hNQO2 [7]. Различия во влиянии М-11 и афобазола на активность hNQO2 может быть связана с типом ингибирования фермента. Например, 2-йодомелатонин – конкурентный ингибитор NQO2 с высоким сродством к MT_3 рецептору слабее ингибирует фермент, чем действующее по бесконкурентному типу соединение S28128 с меньшей аффинностью к MT_3 рецептору [7]. Показано, что афобазол ингибирует hNQO2 по смешанному типу [14], однако полученные в настоящем исследовании результаты не позволяют сделать заключение о типе ингибирования NQO2 соединением М-11, для чего требуется проведение дополнительных кинетических исследований.

М-11 отличается от афобазола по спектру молекулярных мишеней. Если афобазол взаимодействует с $\sigma 1$, MT_1 и MT_3 рецепторами и регуляторным сайтом MAO A, то М-11 – только с MT_3 рецептором [13]. Поэтому сочетание афобазола – М-11 можно рекомендовать для оценки вклада MT_3 рецептора в фармакологические эффекты афобазола.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Кадников Илья Андреевич

Автор, ответственный за переписку

e-mail: ikadnikov@gmail.com

ORCID ID: 0000-0001-8202-3967

SPIN-код: 8995-0919

н. с. лаборатории фармакологической генетики, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Kadnikov Ilya

Corresponding author

e-mail: ikadnikov@gmail.com

ORCID ID: 0000-0001-8202-3967

SPIN code: 8995-0919

Research Officer, laboratories of pharmacological genetics, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Воронин Михаил Владимирович

ORCID ID: 0000-0003-2477-0563

SPIN-код: 6321-4709

к. м. н., с. н. с. лаборатории фармакологической генетики, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Середенин Сергей Борисович

ORCID ID: 0000-0003-4482-9331

SPIN-код: 3896-4655

д. м. н., проф., академик РАН, заведующий лабораторией фармакологической генетики, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Voronin Mikhail

ORCID ID: 0000-0003-2477-0563

SPIN code: 6321-4709

Candidate of Medical Sciences, Senior Research Officer laboratories of pharmacological genetics, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Seredenin Sergey

ORCID ID: 0000-0003-4482-9331

SPIN code: 3896-4655

Doctor of Medical Sciences, Prof., academician of RAS, head of the laboratory of pharmacological genetics, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Iskander K, Li J, Han S, et al. NQO1 and NQO2 regulation of humoral immunity and autoimmunity. *J Biol Chem.* 2006;281(41):30917–30924. DOI: 10.1074/jbc.M605809200
2. Fu Y, Buryanovskyy L, Zhang Z. Quinone reductase 2 is a catechol quinone reductase. *J Biol Chem.* 2008;283(35):23829–23835. DOI: 10.1074/jbc.M801371200
3. Liao S, Dulaney JT, Williams-Ashman HG. Purification and properties of a flavoprotein catalyzing the oxidation of reduced ribosyl nicotinamide. *J Biol Chem.* 1962;237:2981–2987.
4. Jaiswal AK. Human NAD(P)H:quinone oxidoreductase2. Gene structure, activity, and tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.* 1994;269(20):14502–14508.
5. Tissue expression of NQO2. The Human Protein Atlas Web site. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000124588-NQO2/tissue>.
6. Nosjean O, Ferro M, Coge F, et al. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J. Biol. Chem.* 2000;275(40):31311–31317. DOI: 10.1074/jbc.M005141200
7. Mailliet F, Ferry G, Vella F, et al. Characterization of the melatonergic MT3 binding site on the NRH:quinone oxidoreductase 2 enzyme. *Biochem Pharmacol.* 2005;71(1-2):74–88. DOI: 10.1016/j.bcp.2005.09.030
8. Reybier K, Perio P, Ferry G, et al. Insights into the redox cycle of human quinone reductase 2. *Free Radic Res.* 2011;45(10):1184–1195. DOI: 10.3109/10715762.2011.605788
9. Hashimoto T, Nakai M. Increased hippocampal quinone reductase 2 in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2011;502(1):10–12. DOI: 10.1016/j.neulet.2011.07.008
10. Wang W, Le WD, Pan T, et al. Association of NRH:quinone oxidoreductase 2 gene promoter polymorphism with higher gene expression and increased susceptibility to Parkinson's disease. *The Journals of Gerontology: Series A.* 2008;63(2):127–134. DOI: 10.1093/gerona/63.2.127
11. Benoit CE, Bastianetto S, Brouillette J, et al. Loss of quinone reductase 2 function selectively facilitates learning behaviors. *J Neurosci.* 2010;30(38):12690–12700. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2808-10.2010
12. Janda E, Parafati M, Aprigliano S, et al. The antidote effect of quinone oxidoreductase 2 inhibitor against paraquat-induced toxicity *in vitro* and *in vivo*. *Br J Pharmacol.* 2013;168(1):46–59. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.01870.x
13. Середенин СБ, Воронин МВ. Нейропротекторные механизмы действия афобазола // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* – 2009. – Т.72. – №1. – С.3–11. [Seredenin SB, Voronin MV. Neuroreceptor mechanisms involved in the action of afobazole. *Ekspieriment'naya i klinicheskaya farmakologiya.* 2009;72(1):3–11. (In Russ).] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19334502> DOI: <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2009-72-1-3-11>
14. Kadnikov IA, Voronin MV, Seredenin SB. Effect of afobazole on activity of quinone reductase 2. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2014;47(10):514–516 DOI: 10.1007/s11094-014-0993-y
15. Ferry G, Hecht S, Berger S, et al. Old and new inhibitors of quinone reductase 2. *Chem Biol Interact.* 2010;186(2):103–109. DOI: 10.1016/j.cbi.2010.04.006
16. Wu K, Knox R, Sun XZ, et al. Catalytic properties of NAD(P)H:quinone oxidoreductase-2 (NQO2), a dihydronicotinamide riboside dependent oxidoreductase. *Arch Biochem Biophys.* 1997;347(2):221–228. DOI: 10.1006/abbi.1997.0344
17. Leung KK, Shilton BH. Quinone reductase 2 is an adventitious target of protein kinase CK2 inhibitors TBBz (TBI) and DMAT. *Biochemistry.* 2015;54(1):47–59. DOI: 10.1021/bi500959t