

Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2008

Л. В. Татьяненко¹, О. В. Доброхотова¹, Д. В. Мищенко¹, Г. Н. Богданов¹,
Я. Р. Нарциссов²

ВЛИЯНИЕ АМИТРИПТИЛИНА, ИМИПРАМИНА И ХЛОПРОМАЗИНА НА АКТИВНОСТЬ ФОСФОГИДРОЛАЗ

¹ Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка, Московская обл., Россия;

² Научно-исследовательский институт цитологии и молекулярной биологии, Москва, Россия.

Исследовано действие антидепрессантов amitriptилина, имипрамина и нейрореплетика хлорпромазина на функцию фосфогидролаз Ca²⁺-активирующей-Mg²⁺-зависимой АТР-азы саркоплазматического ретикулума (Ca²⁺, Mg²⁺-АТРаза СР), Na⁺, K⁺-зависимой АТРаза эндоплазматического ретикулума (Na⁺, K⁺-АТРаза ЭР) и фосфодиэстеразы (ФДЭ) циклического аденозинмонофосфата (цАМР). Показано, что разобщение функций фермента (снижение [Ca²⁺]/[АТР]) или ингибирование активного транспорта ионов кальция Ca²⁺-Mg²⁺-АТРазой СР исследуемыми препаратами способствует ухудшению транспорта ионов Ca²⁺ в везикулы СР, что приводит к увеличению силы мышечного сокращения, причем для amitriptилина и имипрамина этот эффект снижается по мере увеличения их концентраций, тогда как для хлорпромазина — при уменьшении его концентрации, что указывает на различные механизмы их действия на Ca²⁺-Mg²⁺-АТРазу СР. Amitriptилин является неконкурентным обратимым ингибитором функции Ca²⁺-Mg²⁺-АТРаза СР с константой ингибирования гидролиза АТР K_i = 1,8 · 10⁻⁴ М, а для активного транспорта кальция K_i = 0,7 · 10⁻⁴ М. Задачей настоящего исследования является изучение молекулярных механизмов действия amitriptилина, хлорпромазина и имипрамина.

Задачей настоящего исследования является изучение молекулярных механизмов действия amitriptилина, хлорпромазина и имипрамина.

Методы исследования

В качестве моделей для исследования использовали ключевые ферментные системы — гидралазы, ответственные за жизненно важные процессы живых организмов, -Ca²⁺, Mg²⁺-АТРаза саркоплазматического ретикулума (СР), регулирующие процессы мышечного сокращения, Na⁺, K⁺-зависимая АТРаза эндоплазматического ретикулума (ЭР) и фосфодиэстераза (ФДЭ) циклического аденозинмонофосфата (цАМР). В качестве источника получения каждого фермента брали органы животных, содержащие наибольшее (по удельной активности) количество фермента Ca²⁺, Mg²⁺-АТР-аза СР (мышцы), Na⁺, K⁺-АТРаза ЭР (почки), ФДЭ цАМР (мозг). Экспериментально показано отсутствие тканевой специфичности действия исследуемых препаратов на функции ферментов.

Ca²⁺, Mg²⁺-АТРазу выделяли из белых мышц задних конечностей кроликов [1]. Мышцы помещали в физиологический раствор со льдом (на 100 г мышц — 0,5 л раствора) и 10 мМ ЭДТА, рН 7,5. Затем измельчали ножницами и помещали в среду, содержащую 10 мМ гистидина, 0,1 мМ ЭДТА в 10 % сахарозе, рН 7,0 и гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера. Полученный гомогенат центрифугировали при 10 000 г в течение 20 мин на центрифуге К 32М. Надосадочную жидкость фильтровали через 6 слоев марли. Фильтрат центрифугировали при 36 000 г в течение 60 мин. Осадок суспендировали в среде, содержащей 0,6 М КСl и 10 мМ гистидина при рН 7,0 – 7,2, а затем измельчали в гомогенизаторе Поттера. К полученному гомогенату

добавляли альбумин человека и инкубировали при постоянном перемешивании в холодильнике 8 – 10 ч. Затем гомогенат центрифугировали при 40 000 г в течение 90 мин. Из центрифужных пробирок отбирали средний желеобразный слой, который суспендировали в среде, содержащей 10 мМ гистидина, 0,1 мМ ЭДТА в 30 % сахарозе, рН 7,0. Полученную таким образом Ca²⁺, Mg²⁺-АТРазу замораживали в жидком азоте. Удельная активность Ca²⁺, Mg²⁺-АТРаза составляла 15000 нМ неорганического фосфата, образо-

Таблица 1
Действие amitriptилина, хлорпромазина и имипрамина на гидролитическую и транспортную функции Ca²⁺, Mg²⁺-АТРаза саркоплазматического ретикулума

Препарат	Концентрация, мкМ	Активный транспорт ионов Ca ²⁺ , мМ Ca ²⁺ /мг белка в мин	Гидролиз АТР, мМ P _i /мг белка в мин	[Ca]/[АТР]
Амитриптилин	100	1,4 ± 0,14*	2,8 ± 0,28	0,5
Имипрамин	100	1,7 ± 0,17*	2,4 ± 0,24	0,7
Хлорпромазин	100	2,5 ± 0,25	2,8 ± 0,28	0,9
Амитриптилин	10	1,8 ± 0,18*	2,1 ± 0,21	0,8
Имипрамин	10	1,7 ± 0,17*	2,4 ± 0,24	0,7
Хлорпромазин	10	1,7 ± 0,17*	2,7 ± 0,27	0,6
Амитриптилин	1	1,7 ± 0,17*	1,9 ± 0,19	0,9
Имипрамин	1	2,5 ± 0,25*	2,7 ± 0,27	0,9
Хлорпромазин	1	1,1 ± 0,11*	2,3 ± 0,23	0,5
Контроль	0	3,8 ± 0,36	3,0 ± 0,32	1,3

Примечания: приведены удельные значения 6 – 9 опытов с каждым препаратом (M ± m); * P < 0,01 по сравнению с контролем.

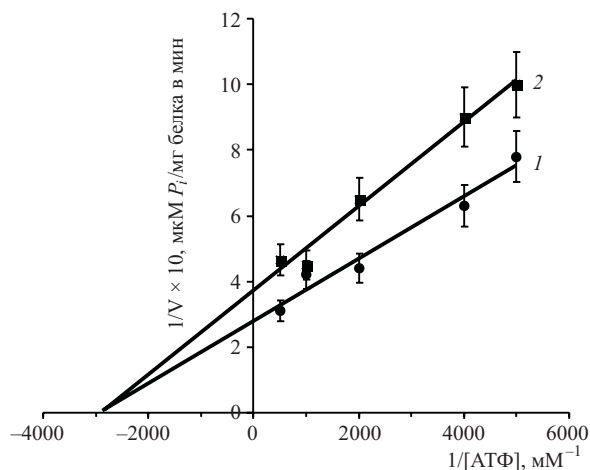


Рис. 1. Влияние амитриптилина на гидролитическую функцию Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы СР при различных концентрациях АТФ: 1 — контроль, 2 — амитриптилин (200 мкМ).

вашего за 1 мин инкубации на 1 мг белка. Концентрацию белка определяли согласно [2, 3]. Гидролитическую активность Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы измеряли по методу [1]. Реакционная среда содержала 4 мМ MgCl_2 , 2,5 мМ имидазола, 100 мМ NaCl , 5 мМ оксалата Na , 0,04 мг белка, 3 мМ АТФ, pH 7,2. Реакцию индуцировали добавлением 0,1 мМ CaCl_2 . Активность Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы определяли по степени изменения pH среды, так как в результате указанной реакции соотношение протонов и фосфат-ионов составляет 1:1. Гидролитическую активность Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы рассчитывали из тангенса угла наклона кинетической кривой гидролиза АТФ. Об активном транспорте ионов Ca^{2+} судили по изменению наклона кривой гидролиза АТФ, т. е. по скорости изменения концентрации ионов кальция в инкубационной среде до полного поглощения везикулами СР. По изменению гидролитической и транспортной функций Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы в присутствии изучаемых препаратов определяли их влияние на активность фермента в зависимости от их концентрации. Относительную активность фермента рассчитывали по формуле:

$$I = 100 \frac{(A_0 - A)}{A_0},$$

где, I — относительная активность, A_0 — содержание неорганического фосфата в контрольной пробе, A — содержание неорганического фосфата в опытной пробе.

Характер ингибирования Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы СР определяли по методу [4]. Исследовали зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата (АТФ) в отсутствие и в присутствии наименее токсичного из числа изученных препаратов в концентрации 200 мкМ. Зависимость ферментативной реакции Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы от концентрации субстрата определяли в координатах Лайнуивера-Берка.

Фермент ФДЭ цАМФ выделяли из коры головного мозга крыс линии Вистар [5]. Ткань головного мозга гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера в 10-кратном по весу количестве охлажденного трис-буфера, pH 7,5. Гомогенат центрифугировали в течение 1 ч при 40 000 г на центрифуге К 32М. Супернатант, содержащий ФДЭ цАМФ, замораживали в жидком азоте. Удельная активность фермента составляла 7 мкМ P_i /мг. Активность ФДЭ цАМФ в присутствии и в отсутствие исследуемых препаратов определяли по количеству образовавшегося в процессе ферментативной

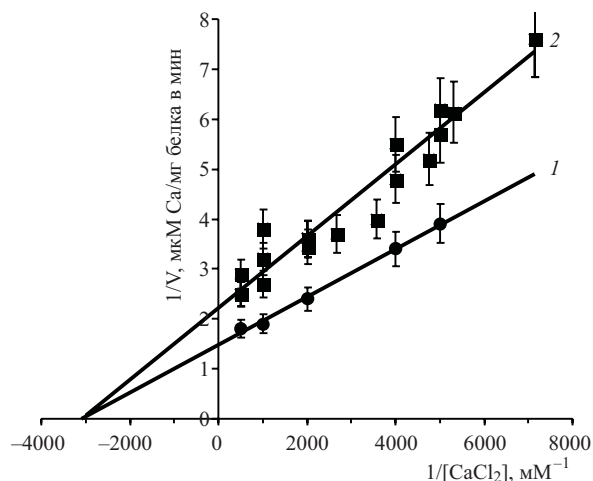


Рис. 2. Влияние амитриптилина на активный транспорт ионов Ca через мембрану саркоплазматического ретикула при различных концентрациях CaCl_2 : 1 — контроль, 2 — амитриптилин (200 мкМ).

реакции неорганического фосфата [5]. К 1 мл 0,2 М трис-буфера (pH 7,6) добавляли аликвоту раствора ФДЭ цАМФ, содержащего 1 мг белка. Исследуемые препараты в концентрациях 100, 10 и 1 мкМ добавляли в виде растворов в ДМСО. Через 30 мин преинкубации при комнатной температуре, добавляли субстрат — 0,1 мМ цАМФ. Пробы выдерживали в течение 20 мин при 30 °С, после чего их помещали на 3 мин в кипящую водяную баню. Затем в охлажденные до комнатной температуры пробы добавляли 50 мкг яда кобры и выдерживали их при 30 °С в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением в каждую пробу по 0,2 мл 55 % трихлоруксусной кислоты, и реакционную смесь центрифугировали при 10 000 г в течение 5 мин. В отделенном супернатанте по реакции с молибдатом аммония при последующем спектрофотометрировании на спектрофотометре “Spereord M-40” определяли содержание неорганического фосфата.

Обратимость действия исследуемых препаратов определяли путем диализа проб, содержащих фермент в отсутствие и в присутствии 200 мкМ соединения в пробе. Диализ проводили против 100-кратного избытка среды инкубации, не содержащей препаратов, в течение 24 ч при 4–5 °С. Мембранно-связанный фермент Na^+ , K^+ -зависимую АТФазу ЭР выделяли по методу [6]. Ферментативную активность определяли по методу [7]. Удельная активность исследуемой в экспериментах Na^+ , K^+ -зависимой АТФазы составляла 30 ± 3 мкМ P_i /мг белка в мин.

Коэффициент $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{АТФ}]$ характеризует степень согласованности функций фермента Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы: трансмембранного переноса ионов Ca^{2+} и гидролиза АТФ. В случае разобщения этих функций фермента коэффициент изменяется в пределах $2 > [\text{Ca}^{2+}]/[\text{АТФ}] > 0$ [8].

Результаты и их обсуждение

Как видно из табл. 1, амитриптилин, имипрамин и хлорпромазин во всех исследуемых концентрациях (1–100 мкМ) практически не влияют на гидролитическую функцию Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы СР, тогда как в аналогичных концентрациях они в значительной степени уменьшают активный транспорт Ca^{2+} через мембрану СР. Наблюдается выраженное разобщение гидролитической и транспортной функций Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы СР.

Таблица 2
Торможение активности Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума при действии амитриптилина, хлорпромазина и имипрамина (до и после диализа в инкубационной среде в % от контрольных проб, не содержащих препарат)

Соединение в концентрации 0,1 мкМ	До диализа		После диализа	
	Гидролиз АТФ, %	Активный транспорт Ca^{2+} , %	Гидролиз АТФ, %	Активный транспорт Ca^{2+} , %
Амитриптилин	20 ± 4*	50 ± 5*	0*	3 ± 0,3*
Хлорпромазин	31 ± 2*	62 ± 6*	0*	11 ± 1*
Имипрамин	22 ± 2*	37 ± 3*	4 ± 0,3*	0*

Примечание: приведены удельные значения 6–9 опытов с каждым препаратом ($M \pm m$); * $P < 0,01$ по сравнению с контролем.

Зависимость скорости гидролиза АТФ от его концентрации представлена в координатах Лайнуивера-Берка. Константа Михаэлиса АТФ равна $3,4 \cdot 10^{-4}$ М (рис. 1). Константа Михаэлиса активного транспорта ионов кальция Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазой СР равна $3,2 \cdot 10^{-4}$ М (рис. 2).

Для изучения характера действия амитриптилина на АТФ и активный транспорт ионов кальция через мембрану СР были исследованы зависимости скорости гидролиза АТФ и транспорта ионов кальция в присутствии исследуемого препарата (рис. 1). Выявлен неконкурентный характер ингибирования амитриптилином гидролитической функции Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы СР, с K_i равной $1,8 \cdot 10^{-4}$ М.

Аналогичные данные получены для процесса активного транспорта Ca^{2+} через мембрану СР (рис. 2). Установлен неконкурентный характер ингибирования активного транспорта Ca^{2+} амитриптилином с $K_i = 0,7 \cdot 10^{-4}$ М.

В табл. 2 представлены данные исследования обратимости действия амитриптилина, имипрамина и хлорпромазина на функции Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы СР. Показано, что все изученные препараты являются обратимыми ингибиторами функции Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы СР, т. к. после диализа их ингибирующее действие на гидролиз АТФ и активный транспорт Ca^{2+} исчезает.

Таким образом, амитриптилин, имипрамин и хлорпромазин в большей степени влияют на активный транспорт Ca^{2+} , чем гидролиз АТФ Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы СР, т. е. обладают энергосберегающим эффектом. Механизм действия хлорпромазина отличается от действия антидепрессантов, т. к. имеет иную направленность ингибирующего действия на фермент.

Как видно из табл. 3, имипрамина, хлорпромазин и в меньшей степени амитриптилин, являются ингибиторами

Таблица 3
Торможение активности Na^+ , K^+ -АТФазы эндоплазматического ретикулума и фосфодиэстеразы цАМФ при действии амитриптилина, имипрамина и хлорпромазина в % от контрольных проб, не содержащих препарат

Препарат	Концентрация, мкМ	Торможение функции Na^+ , K^+ -АТФазы, % от контроля	Торможение активности ФДЭ цАМФ, % от контроля
	10	15 ± 3*	10 ± 1*
	100	29 ± 3*	27 ± 3*
Имипрамин	1	28 ± 3*	0*
	10	31 ± 3*	0*
	100	60 ± 6*	0*
Хлорпромазин	1	38 ± 4*	9 ± 0,9*
	10	43 ± 4*	10 ± 0,8*
	100	54 ± 5*	20 ± 2*

Примечание: приведены удельные значения 6–9 опытов с каждым препаратом ($M \pm m$); * $P < 0,01$ по сравнению с контролем.

Na^+ , K^+ -АТФазы ЭР, хотя все препараты слабо влияют на функцию ФДЭ цАМФ.

Проведенные исследования показали, что изучение молекулярных механизмов действия амитриптилина, хлорпромазина и имипрамина на примерах фосфогидролаз — Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы СР, Na^+ , K^+ -АТФазы ЭР и ФДЭ цАМФ позволяет оптимизировать лечебный эффект исследованных лекарственных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. Б. Ритов, В. И. Мельгунов, П. Г. Комаров и др., Докл. АН СССР, **233**(4), 730 – 733 (1977).
2. Д. Бейли, Методы химии белков, Мир, Москва (1980).
3. А. А. Болдырев, Транспортные аденозинфосфатазы, в кн.: Современные методы исследования, МГУ, Москва (1977), сс. 69 – 79.
4. И. В. Березин, А. А. Клесов, Практический курс химической и ферментативной кинетики, МГУ, Москва (1976), сс. 77 – 84.
5. Р. Е. Либензон, Т. Т. Шеколдина, О. С. Ватолкина, Вопросы мед. химии, **23**(4), 526 – 530 (1977).
6. P. L. Jorgensen, Methods of Enzymology, **3**, 277 – 290 (1974).
7. C. Hegyvary, K. Kang, and Bandi, Anal. Biochem., **94**, 397 – 401 (1979).
8. N. P. Konovalova, L. M. Volkova, L. V. Tatyanyenko, et al., Neoplasma, **44**(6), 361 – 365 (1997).

Поступила 29.01.08

THE INFLUENCE OF AMITRIPTYLINE, CHLOROPROMAZINE AND IMIPRAMINE ON THE ACTIVITY OF PHOSPHOHYDROLASES

L. V. Tat'yanenko¹, O. V. Dobrokhotova¹, D. V. Mischenko¹, G. N. Bogdanov¹, and Ya. R. Nartsissov²

¹ Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow oblast, 142432 Russia

² Institute of Cytology and Molecular Biology, Moscow, Russia

We have studied the effects of amitriptyline, imipramine, and neuroleptic chlorpromazine on the function of enzyme Ca^{2+} -activating- Mg^{2+} -dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum (SPR), Na^+ , K^+ -dependent ATPase of endoplasmatic reticulum (EPR), and phosphodiesterase of cyclic adenosine monophosphate (cAMP). It is shown that violation of the enzyme function (decrease of $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{ATP}]$ ratio) or inhibition of the active transport of Ca^{2+} ions by psychotropic drugs leads to impairment of the Ca transport into SPR vesicle, and to gteh corresponding increase in muscle contraction. This effect decreases with increasing concentrations of amitriptyline and imipramine, and with decreasing concentration of chlorpromazine, which is evidence of the different mechanisms of action on Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of SPR. Amitriptyline was a noncompetitive reversible inhibitor of Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of SPR with a constant of ATP hydrolysis inhibition $K_i = 1.8 \times 10^{-4}$ M, and the constant of active calcium transport inhibition $K_i = 0.7 \times 10^{-4}$ M.