

Л. В. Татьяненко<sup>1</sup>, О. В. Доброхотова<sup>1</sup>, Д. В. Мищенко<sup>1</sup>,  
Г. Н. Богданов<sup>1</sup>, Я. Р. Нарциссов<sup>2</sup>

## ВЛИЯНИЕ ПРОТИВОСУДОРОЖНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА АКТИВНОСТЬ СПЕЦИФИЧЕСКИХ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ГИДРОЛАЗ

<sup>1</sup> Институт проблем химической физики РАН, г. Черноголовка, Московская обл., Россия;

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт цитологии и молекулярной биологии, Москва, Россия

Противосудорожные препараты ряда гетероциклических амидов в опытах *in vitro* тормозят ферментативную активность  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы саркоплазматического ретикулума. При этом сохраняется сбалансированность соотношения удельных скоростей активируемого трансмембранного переноса ионов кальция и гидролиза АТФ, что обеспечивает снижение концентрации ионов кальция в миофибриллах и расслабление мышц. Этосуксимида является неконкурентным ингибитором обратимого действия на основные процессы, катализируемые ферментом.

Подавление гидролитической активности фермента при действии этосуксимида, фенитоина и примидона сопоставлено с их влиянием на другие фосфатазы (фосфодиэстеразу цАМФ и  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -зависимую АТФазу).

Молекулярные механизмы произвольных сокращений мышц в состоянии их крайне высокого напряжения (судорог) включают процессы согласованного функционирования ферментативного аппарата саркоплазматического ретикулума миофибрилл. Его основу составляет мембранно-связанная  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемая,  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимая — АТФаза ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаза), ключевой фермент мышечного сокращения, обусловленного трансмембранным переносом ионов  $\text{Ca}^{2+}$  против концентрационного градиента за счет гидролиза макроэргических связей аденозинтрифосфата (АТФ).

Однако до сих пор вопрос непосредственного влияния противосудорожных препаратов на гидролитическую и транспортную функции этого фермента остается неизученным. Противосудорожное действие, состоящее в расслаблении мышц, происходит при снижении концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в миофибриллах. Это достигается оптимизацией трансмембранного переноса кальция, контролируемой соотношением  $\alpha = [\text{Ca}^{2+}]/[\text{АТФ}]$  удельных скоростей транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  и гидролиза АТФ [1]. В данной работе приведены результаты исследования влияния противосудорожных препаратов этосуксимида, фенитоина и примидона на активность ключевого фермента мышечного сокращения.

### Методы исследований

Мембраносвязанный фермент  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазу саркоплазматического ретикулума (СР) выделяли из белых мышц задних конечностей кроликов по известной методике [2]. Об активном транспорте ионов  $\text{Ca}^{2+}$  судили по скорости увеличения их концентрации. Гидролитическую активность  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы определяли рН-метрическим методом [3] и по кинетической кривой увеличения рН реакционной среды (т. е. образования неорганического фосфата ( $\text{P}_i$ ) при гидролизе АТФ) рассчитывали относительную активность фермента:

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

где,  $I$  — относительная активность,  $A_0$  — содержание  $\text{P}_i$  в контрольной пробе,  $A$  — содержание  $\text{P}_i$  в опытной пробе, содержащей исследуемый препарат.

Характер ингибирования  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы СР определяли по методу [4]. Исследовали зависимости скоростей гидролиза АТФ и трансмембранного переноса ионов кальция от концентрации субстратов (АТФ или  $\text{CaCl}_2$ ) в отсутствие и в присутствии этосуксимида. Константы ингибирования и Михаэлиса определяли по графику в двойных координатах Лайнуивера-Берка [5].

Препарат, содержащий фосфодиэстеразу (ФДЭ) циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), готовили из коры головного мозга крыс линии Вистар. Ткань головного мозга измельчали в гомогенизаторе Поттера в 10-кратном по весу количестве охлажденного трис-буфера, рН 7,5. Гомогенат центрифугировали в течение 1 ч при 40000 g. Супернатант, содержащий ФДЭ цАМФ, с определенным по Лоури удельным содержанием белка хранили в виде замороженных в жидком азоте капель. Для определения удельной диэстеразной активности, равной 7 мкМ  $\text{P}_i$ /мг белка в мин, использовали цАМФ фирмы Sigma.

Обратимость действия этосуксимида определяли путем диализа проб, содержащих фермент в отсутствие и в присутствии 100 мкМ препарата в пробе. Диализ проводили против 100-кратного избытка среды инкубации в течение 24 ч при 4 – 5 °С.

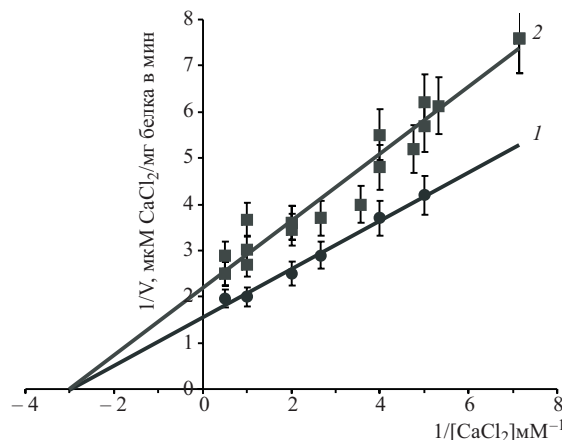
Мембраносвязанный фермент  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазу эндоплазматического ретикулума (ЭР) выделяли по методу [6]. Ферментативную активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы определяли по методу [7]. Ее удельная активность составляла  $30 \pm 3$  мкМ  $\text{P}_i$ /мг белка в мин.

### Результаты и их обсуждение

Изучение влияния противосудорожных препаратов на ферментативную активность  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы СР показало, что все они подавляют процессы как гидро-

лиза АТР, так и трансмембранного переноса ионов  $\text{Ca}^{2+}$  (табл. 1). При этом по мере увеличения на 2 порядка (1 – 100 мкМ) действующей концентрации этосуксимида и примидона закономерно возрастают значения процента ингибирования ферментативной активности (в среднем на 35 – 60 %). Вместе с тем практически не зависят от концентрации соотношения  $\alpha$  удельных скоростей транспорта и гидролиза АТР, составляющие в случае этосуксимида ( $\alpha$ ) 1,6 – 1,7. Для примидона эта величина (1,3 – 1,5) близка к контрольному значению. Это означает, что даже при значительном подавлении ферментативной активности  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРАЗы СР сохраняется баланс активируемого транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  и гидролиза АТФ без ощутимого разобщения этих 2 функций ключевого фермента мышечного сокращения.

Методами ферментативной кинетики проведено изучение ингибирующего действия этосуксимида на гидролитическую и транспортную функции  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРАЗы СР. Этот препарат, как следует из рис. 1, является неконкурентным ингибитором ферментативного гидролиза АТР. При этом кажущаяся константа Михаэлиса равна  $K_m = 0,30$  мМ, а константа ингибирования  $K_i = 0,90 \cdot 10^{-4}$  М. На рис. 1 приведены данные в двойных координатах Лайнуивера-Берка по зависимости удельных скоростей трансмембранного переноса  $\text{Ca}^{2+}$  от концентрации  $\text{CaCl}_2$  в отсутствие и в присутствии этосуксимида. В целом также неконкурентно ингибируется процесс трансмембранного переноса  $\text{Ca}^{2+}$  в присутствии этосуксимида, причем значения константы Михаэлиса и константы ингибирования составляют соответственно  $K_m = 0,33$  мМ и  $K_i = 0,94 \cdot 10^{-4}$  М. Это означает, что оба ферментативных процесса, катализируемые  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРАЗой, подавляются этосуксимидом неконкурентно и в одинаковой степени эффективно. Неконкурентный характер ингибирования и умеренные значения  $K_m$  дают



Ингибирование этосуксимидом трансмембранного переноса ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через мембрану саркоплазматического ретикулума: 1 — контроль, 2 — этосуксимид (100 мкМ).

основание полагать, что этосуксимид не связывается ковалентно ни с активным центром фермента, ответственным за гидролиз АТР, ни с белками  $\text{Ca}^{2+}$ -проводящих каналов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРАЗы СР. В определенной степени об этом свидетельствует обратимость ингибирования этосуксимидом обеих функций фермента. Нормированные значения удельной скорости гидролиза АТР до и после диализа составляют соответственно  $0,41 \pm 0,02$  и  $< 0,02$ . Для процесса трансмембранного переноса  $\text{Ca}^{2+}$  эта величина до диализа составляет  $0,62 \pm 0,05$ , а после диализа —  $0,11 \pm 0,01$ .

Что касается фенитоина, то его ингибирующий эффект на  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРАЗу СР практически не зависит от концентрации. Кроме того, обращает внимание разнонаправленность тенденции изменения скоростей трансмембранного процесса переноса  $\text{Ca}^{2+}$  и гидролиза АТР по мере увеличения действующей концентрации. При этом скорость транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  возрастает с 1,47 до 1,80, а скорость гидролиза снижается с 1,13 до 0,89. Такую разнонаправленность обеих функций  $\text{Ca}^{2+}$ ,

Таблица 1  
Влияние противосудорожных препаратов на активность  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРАЗы саркоплазматического ретикулума

Препарат	Концентрация, мкМ	Удельная скорость трансмембранного переноса $\text{Ca}^{2+}$ , мМ $\text{CaCl}_2$ /мг белка в мин	Удельная скорость гидролиза АТР, мМ Pi/мг белка в мин	$\alpha$
Этосуксимид	1	$2,20 \pm 0,17^*$	$1,38 \pm 0,11^*$	1,6
	10	$2,00 \pm 0,18^*$	$1,18 \pm 0,12^*$	1,7
	100	$1,60 \pm 0,15^*$	$0,95 \pm 0,10^*$	1,7
Примидон	1	$1,90 \pm 0,15^*$	$1,30 \pm 0,12^*$	1,5
	10	$1,60 \pm 0,12^*$	$1,14 \pm 0,10^*$	1,4
Фенитоин	100	$1,10 \pm 0,10^*$	$0,85 \pm 0,10^*$	1,3
	1	$1,47 \pm 0,12^*$	$1,13 \pm 0,10^*$	1,3
	10	$1,66 \pm 0,12^*$	$1,10 \pm 0,10^*$	1,5
Контроль	100	$1,80 \pm 0,14^*$	$0,89 \pm 0,08^*$	1,9
	0	$3,60 \pm 0,25$	$2,60 \pm 0,30$	1,4

Примечания: приведены удельные значения 6–9 опытов с каждым препаратом ( $M \pm m$ ); \*  $P < 0,01$  по отношению к контролю.

Таблица 2  
Влияние противосудорожных препаратов на активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРАЗы эндоплазматического ретикулума и фосфоэстераза цАМФ

Препарат	Концентрация, мкМ	Степень торможения активности ферментов, %	
		$\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТРаза	фосфоэстераза цАМФ
Этосуксимид	1	$35 \pm 4^*$	$18 \pm 2^*$
	10	$65 \pm 7^*$	$19 \pm 3^*$
	100	$70 \pm 7^*$	$22 \pm 4^*$
Примидон	1	$< 5 \pm 0,5^*$	$40 \pm 4^*$
	10	$24 \pm 3^*$	$43 \pm 5^*$
Фенитоин	100	$52 \pm 5^*$	$43 \pm 6^*$
	1	$26 \pm 3^*$	$29 \pm 3^*$
	10	$37 \pm 4^*$	$45 \pm 5^*$
Контроль	100	$21 \pm 3^*$	$59 \pm 6^*$

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

Mg<sup>2+</sup>-АТФазы СР можно рассматривать как проявление их разобщения, вызываемого фенитоином. Оно, вероятно, является следствием структурных перестроек липидного бислоя под влиянием препарата. В ряду изученных гетероциклических амидов он отличается наибольшей гидрофобностью, поскольку его структура содержит два фенильных заместителя. Фенитоин, обладающий выраженными липофильными, а значит, и мембранотропными свойствами посредством изменения структуры липидного бислоя и липид-белковых взаимодействий, может блокировать Ca<sup>2+</sup>-проводящие каналы.

Если трансмембранный перенос Ca<sup>2+</sup> является уникальной функцией Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТФазы СР, то гидролиз АТФ с разрывом макроэргической связи и отщеплением неорганического фосфата характерен для многих других энергозависимых ферментов. В связи с этим определенный интерес представляет сопоставление гидролитической активности Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТФазы с активностью ион-переносящего фермента (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-зависимой АТФазы), а также субстрат-специфичной ФДЭ цАМФ. Напомним, что для Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТФазы ингибирование противосудорожными препаратами гидролиза АТФ в зависимости от концентрации (1 – 100 мкМ) изменяется от 35 до 60 %.

Ингибирование активности Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы и ФДЭ цАМФ в зависимости от концентрации изученных противосудорожных препаратов представлено в табл. 2.

## MODULATION OF CONTRACTILE ENZYME ACTIVITY BY ANTICONVULSANT DRUGS

L. V. Tat'yanenko<sup>1</sup>, O. V. Dobrokhotova<sup>1</sup>, D. V. Mischenko<sup>1</sup>, G. N. Bogdanov<sup>1</sup>, and Ya. R. Nartsissov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow oblast, 142432 Russia

<sup>2</sup> Institute of Cytology and Molecular Biology, Moscow, Russia

Anticonvulsant drugs of the heterocyclic amide family *in vitro* inhibit enzymatic activity of Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATPase of sarcoplasmic reticulum, the activated transmembrane calcium ion transfer/ATP hydrolysis specific rate ratio being retained to provide lower concentrations of calcium ions in myofibrilla and relaxed muscles. Ethosuccimide is a noncompetitive inhibitor with reversible action on basic enzyme catalyzed processes. The inhibition of the hydrolytic activity of enzyme under the action of ethosuccimide, phenytoin and primidone was compared to their effect on other phosphatases (cAMP phosphodiesterase and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-dependent ATPase)

Видно, что процент ингибирования варьирует в том же диапазоне. Для Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы ингибирующий эффект вырастает в несколько раз с увеличением в 100 раз действующей концентрации этосуксимида, примидона и фенитоина. Для ФДЭ цАМФ такой результат дает только фенитоин, тогда как в случае этосуксимида или примидона эффект не зависит от действующей концентрации.

В целом эти результаты, указывающие на отсутствие специфичности ингибирующего действия изученных противосудорожных препаратов на различные фосфатазы, могут иметь отношение к проявлению их побочных эффектов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Л. В. Татьянаенко, Н. П. Коновалова, Г. Н. Богданов и др., *Биомед. химия*, **52**(1), 52 – 59 (2006).
2. В. Б. Ритов, В. И. Мельгунов, П. Г. Комаров и др., *Докл. АН СССР*, **233**(4), 730 – 733 (1977).
3. Д. Бейли, *Методы химии белков*, Мир, Москва (1980).
4. А. А. Болдырев, *Транспортные аденозинфосфатазы*, в кн.: *Современные методы исследования*, МГУ, Москва (1977), сс. 69 – 79.
5. И. В. Березин, А. А. Клесов, *Практический курс химической и ферментативной кинетики*, МГУ, Москва (1976), сс. 77 – 84.
6. Р. Е. Либензон, Т. Т. Шеколдина, О. С. Ватолкина, *Вопросы мед. химии*, **23**(4), 526 – 530 (1977).
7. P. L. Jorgensen, *Methods of Enzymol.*, **3**, 277 – 290 (1974).

Поступила 07.02.08