

УДК 577:615.547

ЦИТОХРОМ P450 – ЗАВИСИМЫЙ МЕТАБОЛИЗМ ПСИХОТРОПНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СУБСТРАТОВ В МИКРОСОМАХ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

А.Н. Фаттахова, А.В. Абдульянов, А.Ф. Хакимова, Э.Р. Мингалеева

Аннотация

Установлено, что лекарственные субстраты аминазин, диазепам, амитриптилин и кордиамин являются субстратами I типа для цитохромов P450 коры головного мозга человека. В микросомах коры головного мозга пациентов с диагнозом F20-F29 «органический психоз» по сравнению с пациентами с диагнозом F1-F9 «шизофрения» скорость N-деметилирования аминазина повышена в 30 раз ($p < 0.001$), амитриптилина в 60.6 раза ($p < 0.0001$), диазепама в 42.7 раза ($p < 0.01$) и скорость N-деэтилирования кордиамина повышена в 30 раз ($p < 0.001$). Ингибиторы клинически важных цитохромов P450 печени галоперидол, эритромицин и кетоконазол в дозах от 10^{-5} до 10^{-7} М снижали скорость N-деметилирования диазепама в микросомах коры пациентов с диагнозом «органический психоз» на 88–86%.

Введение

В гладком ЭПР астроцитов и нейронов локализованы тканеспецифичные цитохромы P450 [1], определяющие метаболизм лекарственных субстратов, проникающих через гематоэнцефалический барьер. Терапевтический эффект таких препаратов, а также величина клиренса зависят от активности микросом мозга, а не печени. У человека и животных регуляция цитохромов P450 мозга значительно отличается от регуляции цитохромов P450 печени. Например, аминазин и алпрозолам образуют специфичные для ткани мозга крысы метаболиты, не обнаруженные в печени [2]. Тканеспецифичные цитохромы могут изменить метаболизм лекарственных субстратов, что приводит к образованию токсичных или терапевтически неактивных метаболитов.

Метаболизм галоперидола, диазепама и амитриптилина в печени человека катализируют клинически важные цитохромы CYP2D6 и CYP3A4 [2]. Показано [3], что в коре головного мозга человека присутствует цитохром CYP2D6, отличный, по мнению автора, от CYP2D6 печени. Выяснение роли отдельных клинически важных цитохромов P450 мозга или общего пула цитохромов в метаболизме каждой лекарственной структуры, а также выявление активности и регуляции активности под воздействием ингибиторов и индукторов цитохромов P450, определение скорости образования субстрат ферментного комплекса являются главным для предсказания поведения лекарства в организме пациента.

Целью данного исследования явился сравнительный анализ скорости цитохром P450-зависимого N-деметилирования лекарственных препаратов амитриптилина, диазепама, аминазина и кордиамина в микросомальной фракции

фронтальной коры головного мозга людей, условно здоровых, и пациентов с диагнозом «органический психоз» и «шизофрения».

Методика

В качестве объектов исследования использовали образцы коры головного мозга двух условно здоровых мужчин 25 и 19 лет, погибших в ДТП. Образцы предоставлены моргом судебной медицинской экспертизы. Известно, что данные люди не состояли на учете в наркологическом и психиатрическом диспансерах, не употребляли алкоголь и наркотики на момент смерти. В опытах также использовали образцы коры головного мозга пациентов с диагнозом F1-F9 «шизофрения» ($n = 10$) и диагнозом F20-F29 «органический психоз» ($n = 8$) в возрасте 25–69 лет. Анализ лечебных дел показал, что пациенты принимали галоперидол, аминазин, но не принимали фенобарбитал и антибиотики, являющиеся ингибиторами или индукторами цитохромов P450.

В опытах использовали **aminaзин** [(2-хлор-10-(3-диметиламинопропил) – фенотиазина гидрохлорид)] (ЗАО «Брынцалов – А»), **кордиамин** (25% раствор диэтиламида никотиновой кислоты («ICN Pharmaceuticals»)), **амитриптилин** [(3-диметиламино пропилиден)-10,11- дигидробензо – циклогептен] («Словакофарм»), **диазепам** [(7-хлор-2,3-дигидро-1-метил-5-фенил-14-1,4-бензодиазипин-2-он)] (Варшавский фармацевтический завод Польша), **эритромицина фосфат** (ОАО «Синтез», г. Курган), **галоперидол** (ЗАО «Брынцалов – А»), **кетоконазол** («ICN Pharmaceuticals»), NADP+ («SIGMA»), D-глюкозо-6-фосфата натриевая соль («SIGMA»), глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа («SIGMA»), реактив Нэша, содержащий 2 М ацетата аммония, 0.05 М уксусной кислоты и 0.02 М ацетилацетона («FLUKA»).

Микросомальные фракции коры головного мозга получали, как указано [4]. Для количественного определения белка и цитохромов P450 использовали метод Omura и Sato в модификации Guengerich [5]. Для получения дифференциальных спектров фермент субстратных комплексов составляли реакционные смеси, содержащие 50 мМ фосфатного буфера pH 7.0, 1.5 нмоль P450/мл и субстраты в дозах от 0.02 до 7 мМ. Смеси инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Измерения проводили на Спекорде Perkin Elmer Lambda-35.

Активность N-деметилирования аминазина, амитриптилина, диазепама и N-деэтилирования кордиамина определяли в реакционных смесях объемом 1.5 мл, содержащих 0.45 мкМ НАДФ, 5 мкМ глюкозо-6-фосфата, 50 мкМ глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, 50 мМ фосфатного буфера pH 7.0, 2.5 нмоль P450 в микросомах по методике [5]. Смеси инкубировали 30 мин. при 37°C и определяли количество формальдегида, для чего 1.5 мл реакционной смеси смешивали 0.75 мл реактива Нэша и измеряли поглощение при 412 нм. Количество формальдегида рассчитывали, используя коэффициент экстинкции $E = 8000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [6]. Активность выражали в мкмоль формальдегида/нмоль P450 в мин. Для проведения ингибиторного анализа использовали галоперидол (ингибитор CYP 2D6), кетоконазол и эритромицин (ингибиторы CYP 3A4) в дозах от 10^{-5} до 10^{-7} М.

Результаты

С целью определения являются ли субстратами цитохрома P450 мозга человека диазепам, амитриптилин, кордиамин и аминазин, исследовали дифференциальные спектры комплексов с микросомами, содержащими цитохромы P450 мозга условно здоровых людей и пациентов с диагнозами «шизофрения» и «органический психоз». Анализ дифференциальных спектров позволил заключить, что исследуемые препараты являются субстратами I типа, так как полученные кривые имели максимумы поглощения в области $\lambda = 380\text{--}390$ нм и минимумы в области $\lambda = 400\text{--}420$ нм (табл. 1) и по принятым положениям взаимодействуют с субстрат связывающим центром, расположенном в апоферменте и с гемом.

Табл. 1
Максимальные и минимальные значения дифференциальных спектров поглощения комплексов, нм [цитохром P450: субстрат]

	Усл. здоровые		Орган. психоз		шизофрения	
	min	max	min	max	min	max
кордиамин	408	382	410	375	407	387
амитриптилин	409	382	410	379	409	388
диазепам	408	382	415	376	409	388
aminaзин	408	378	412	382	409	388

Образование комплексов свидетельствовало о том, что цитохромы P450 мозга человека катализируют метаболизм аминазина, кордиамина, амитриптилина и диазепама.

Анализ динамик комплексов позволил вычислить значения спектральных констант K_s для каждого лекарственного субстрата методом обратных величин. Следует отметить, что величина K_s , обозначающая количество субстрата, при котором скорость образования субстрат-ферментного комплекса составляет половину максимальной скорости [5], свидетельствует не только о скорости метаболизма субстрата, но скорее об эффективности и субстратной специфичности цитохромов P450. Сопоставление значений K_s позволяет выявить определенную закономерность в случаях всех субстратов. Снижение K_s в микросомах коры мозга пациентов с диагнозом «органический психоз» свидетельствует о более высокой аффинности и субстратной специфичности цитохромов P450 к изучаемым субстратам, чем в случае пациентов с диагнозом «шизофрения» и условно здоровых людей (табл. 2).

Полученные результаты свидетельствовали о селекции более специфичных к данным субстратам изозимов цитохромов P450 мозга при шизофрении и органического психозе.

Известно, что все исследуемые субстраты в печени человека подвергаются N-деметилированию и N-деэтированию под воздействием цитохромов CYP2D6 и CYP3A4 [7, 8].

Табл. 2

Значения спектральных констант K_s образования фермент субстратных комплексов цитохромов P450 и исследуемых субстратов в микросомах коры головного мозга

патология	диазепам	аминазин	кордиамин	амитриптилин
Орг. психоз	0.06 + 0.002	0.34 + 0.05	0.45 + 0.005	0.22 + 0.005
шизофрения	0.14 + 0.01	1.5 + 0.01		0.17 + 0.03
здоровые	0.76 + 0.02	6.73 + 0.04	0.56 + 0.005	0.34 + 0.002

В табл. 3 показано, что для всех субстратов скорость N-деметилирования в микросомах коры головного мозга условно здоровых людей статистически достоверно отличалась от показателей пациентов психиатрической больницы. Скорость N-деметилирования аминазина значительно превышала скорость реакции с другими субстратами. Возможно, этот факт можно объяснить тем, что пациенты с диагнозом «органический психоз» и «шизофрения» получали аминазин в значительном количестве, что привело к индукции цитохромов P450, катализирующих метаболизм аминазина. Однако известно, что аминазин не является индуктором CYP 2D6 и CYP 3A4 в печени человека [8].

Табл. 3

Скорость N-деметилирования психотропных препаратов и N-деэтилирования кордиамин в микросомах коры головного мозга условно здоровых людей и пациентов с диагнозами F1-F9 «шизофрения» и F20-F29 «органический психоз» (мкмоль формальдегида / нмоль P450 × мин.)

Патология	Диазепам	Амитриптилин	Кордиамин	Аминазин
здоровые	0.23 – 0.25	0.27 – 0.3	0.26 – 0.32	0.93 – 0.98
орг. психоз	2.9 + 0.03	3.1 + 0.03	2.73 + 0.06	20.6 + 0.03
шизофрения	0.07 – 0.09	0.05 – 0.08	0.09 – 1.1	0.39 + 0.05

Следует отметить, что все исследуемые субстраты окислялись в микросомах мозга пациентов с диагнозом «органический психоз» с более высокой скоростью, чем в микросомах условно-здоровых людей и пациентов с диагнозом «шизофрения» (табл. 3). При одинаковой лекарственной нагрузке (аминазин и галоперидол) скорость N-деметилирования при органическом психозе и шизофрении отличалась в 52.7 раза в случае аминазина, в 30 раз в случае кордиамин, в 42.7 раза в случае диазепама и в 60.6 раза в случае амитриптилина. Поскольку расчеты активности производили на нмоль P450, можно предположить, что выявленные различия отражают качественные изменения активности цитохромов P450 при органическом психозе. Следует отметить, что повышенная скорость метаболизма азотосодержащих лекарственных субстратов снижает их терапевтический эффект для пациентов с диагнозом «органический психоз».

Известно, что галоперидол является ингибитором 2D6 печени человека [7], зритромицин и кетаканозол – селективными ингибиторами 3A4 [9]. В астроглии и нейронах коры головного мозга человека обнаружены изоферменты 2D6, отличные по иммунохимическим показателям от 2D6 печени [3]. Возможно, что метаболизм психотропных субстратов катализирует специфичные только для нервной ткани изоформы CYP2D6 и 3A. Установлено, что в присутствии га-

лоперидола, кетоконазола и эритромицина в дозах от 10^{-5} до 10^{-7} М в микросомах коры головного мозга пациентов с диагнозом «органический психоз» активность N-деметиляции диазепама снижалась на 86–88%. Таким образом, можно заключить, что микросомы коры головного мозга человека содержат специфичные изоферменты цитохромов CYP 2D6 и CYP 3A, катализирующие N-деметилование amitriptилина, диазепама, аминазина и N-деэтилование кордиамина. Изоферментный состав цитохромов P450 отличается при органическом психозе и шизофрении.

Работа выполнена при поддержке Фонда НИОКР Республики Татарстан (проект № 03-3.2-161/2004).

Summary

A.N. Fattakhova, V.A. Abdulyanov, A.F. Khakimova, E.R. Mingaleeva. The metabolism of neuroleptics in human brain cortex microsomes.

Neuroleptics chlorpromazine, diazepam, amitriptylin and cordiamine were determined as I type substrates of cytochromes P450 in the cortex of human brain. In brain microsomes of psychotic patients F20-F29 the activity of chlorpromazine N-demethylation was increased in 30 times ($p < 0.001$), amitriptylin in 60.6 times ($p < 0.0001$), diazepam in 42.7 times ($p < 0.01$) and cordiamine N-deethylation was increased in 30 times ($p < 0.001$) in comparison with schizophrenic F1-F9 patients. The diazepam N-demethylation activity in cortex of psychotic patients was inhibited by the 10^{-5} – 10^{-7} M of haloperidol, ketoconazol and erythromycin by 86–88%.

Литература

1. *Abdulla D., Renton W.* b-Adrenergic receptor modulation of the LPS-mediated depression in CYP1A activity in astrocytes // *Biochemical Pharmacology*. – 2005. – V. 69. – P. 741–750.
2. *Pai H., Upadhy S.* Differential metabolism of alprazolam by liver and brain cytochrome (P4503A) to pharmacologically active metabolite // *Pharmacogenomics J.* – 2002. – V. 4 – P. 243–258.
3. *Chinta S., Pai H., Upadhy S., Boyd M., Ravindranath V.* Constitutive expression and localization of the major drug metabolizing enzyme, cytochrome P4502D in human brain // *Brain Res. Mol. Brain Res.* – 2002. – V. 103. – P. 49–61.
4. *Фаттахова А.Н.* Методы молекулярной фармакологии. – Казань: Изд-во Казан. унта, 2002. – С. 21–22.
5. *Guengerich F.P.* Analysis and characterization of enzymes // *Principles and Methods of Toxicology*. – N. Y.: Ltd., 1998. – P. 777–814.
6. *Nash T.* The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction // *Biochemical J.* – 1953. – V. 55, No 3. – P. 416–421.
7. *Daniel W., Haduch J.* Inhibition of rat liver CYP2D in vitro and after 1-day and long-term exposure to neuroleptics in vivo – possible involvement of different mechanisms // *Eur. Neuropsychopharmacology*. – 2005. – V. 15. – P. 103–110.
8. *Lovlie R., Daly A.* Polymorphisms in CYP2D6 duplication negative individuals with ultrarapid metabolizer phenotype: a role for the CYP2D6*35 allele in ultrarapid metabolism // *Pharmacogenetics*. – 2001. – V. 11. – P. 45–55.

9. *Khawja A., Hodgson E., Randy L.* In vitro metabolism of carbofuran by human, mouse, and rat cytochrome P450 and interactions with chlorpyrifos, testosterone, and estradiol // *Chemico-Biological Interactions.* – 2004. – V. 150. – P. 221–232.

Поступила в редакцию
26.09.05

Фаттахова Альфия Нурлимамовна – кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии Казанского государственного университета.

E-mail: afattakh@rambler.ru

Абдульяхнов Васил Алиевич – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии Казанского государственного медицинского университета.

Хакимова Айгуль Фаритовна – студент кафедры биохимии Казанского государственного университета.

Мингалеева Эльмира Ренатовна – студент кафедры биохимии Казанского государственного университета.