

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.822.1.015

НЕЙРОЛЕПТИКИ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ ПОДАВЛЯЮТ
H⁺-ТРАНСПОРТ В МЕМБРАНАХ СИНАПТИЧЕСКИХ
ПУЗЫРЬКОВ МОЗГА КРЫС

МЕЛЬНИК В. И., ШУКАЛОВА Т. Ф., ГЛЕБОВ Р. Н.

НИИ общей патологии и патологической физиологии АМН СССР, Москва

Нейрелептики состоят из нескольких групп веществ, имеющих мало общего между собой в химическом строении. Известные к настоящему времени биохимические и фармакологические свойства их весьма сильно различаются—в одних случаях (бутирофеноны) ярко выражены свойства блокаторов дофаминовых рецепторов, в других (фенотиазины)—блокаторов кальмодулина, в третьих (резерпин)—истощение запасов биогенных аминов [1]. Общего механизма, присущего всем группам нейрелептиков, пока не найдено.

В свое время мы обнаружили, что один из нейрелептиков—трифтазин весьма эффективно устраняет генерацию градиентов pH в синаптических пузырьках (СП) мозга крыс, которая осуществляется АТР-зависимым H⁺-насосом (H⁺-АТРазой) [2]. Поддержание кислой среды внутри СП—важная функция H⁺-насоса, поскольку от этого прямо зависят аккумуляция и депонирование, а в ряде случаев—и синтез медиаторов [3, 4]. В настоящей работе исследовано влияние других наиболее распространенных и применяемых в клинике нейрелептиков из различных групп на активный, АТР-зависимый H⁺-транспорт в изолированных мембранах СП. Для исследования были выбраны трифтазин и хлорпромазин как представители фенотиазинов, галоперидол и дроперидол как представители бутирофенонов, а также алкалоид растительного происхождения—резерпин. Результаты показывают, что устранение градиентов pH является общим свойством всех нейрелептиков.

Мембраны СП, лишенные содержимого («тени»), получали путем дифференциального центрифугирования осмотически разрушенной фракции синапсом головного мозга крыс [5]. Осадок мембран СП суспендировали в 0,3 М сахарозе, 10 мМ НЕРЕС/трис pH 7,4 и хранили при —20°.

Активный транспорт H⁺ измеряли методом непрерывной регистрации изменений флуоресценции слабо-основного зонда акридиноранжа [5, 6]. Среда измерения содержала 1 мкМ акридиноранж, 150 мМ

KCl, 20 mM HEPES/трис pH 7,4 при 25°. Через 4 мин после добавления мембран СП (7—15 мкг белка/мл) инициировали H^+ -транспорт добавлением 1 mM Mg-АТФ. Исследуемые соединения-нейролептики вносили в среду перед добавлением мембран СП. Транспортную активность выражали с помощью двух параметров—начальной скорости транспорта и стационарной аккумуляции протонов как описано ранее [5].

В работе использовали резерпин и трифтазин («Serva», ФРГ), галоперидол и дроперидол («Г. Рихтер», Венгрия) и хлорпромазин (аминазин) отечественного производства. Резерпин растворяли в диметилсульфоксиде, конечная концентрация которого в пробах не превышала 0,5% (в этой концентрации растворитель не влиял на H^+ -транспорт). Остальные нейролептики применяли в виде водных растворов.

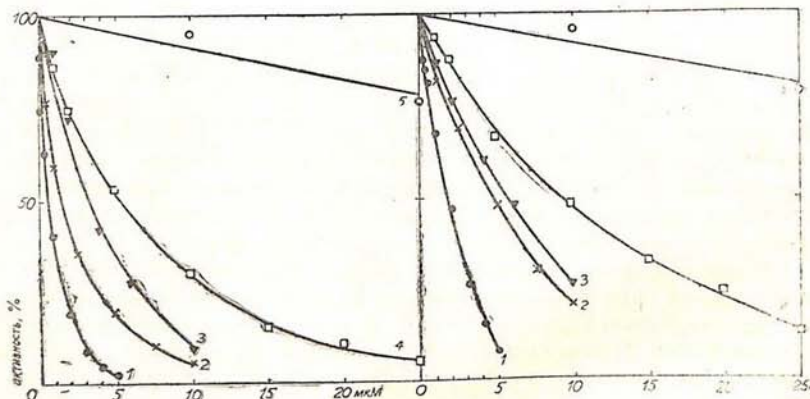


Рис. 1. Влияние различных нейролептиков на стационарную аккумуляцию протонов (а) и начальную скорость транспорта (б) H^+ -насосом в мембранах СП. 1—трифтазин, 2—хлорпромазин, 3—резерпин, 4—галоперидол, 5—дроперидол

Все исследованные нейролептики подавляли АТФ-зависимый H^+ -транспорт концентрационнозависимым образом. На рис. 1, а представлены изменения стационарной аккумуляции протонов. Этот параметр, пропорциональный достигаемой внутри СП концентрации H^+ , более физиологичен, чем скорость транспорта. Ингибирование H^+ -транспорта нейролептиками наблюдалось в субмикромольном и микромольном диапазонах концентраций. По эффективности ингибирования нейролептики располагались в следующей последовательности: трифтазин > хлорпромазин > резерпин > галоперидол >> дроперидол. Соответствующие величины IC_{50} составили 1,0; 2,2; 4,3; 7,7 и 49 мкМ.

Аналогичным образом под влиянием нейролептиков изменялась начальная скорость транспорта H^+ (рис. 1, б). Порядок эффективности сохранялся, а отличие заключается в том, что соответствующие

величины IC_{50} были в 1,5—2 раза выше, чем для аккумуляции протонов.

Наряду с ингибированием АТФ-зависимого H^+ -транспорта все нейролептики в том же диапазоне концентраций устраняли эндогенный градиент рН, который частично сохраняется в мембранах СП после выделения, но довольно быстро диссипирует при инкубации в отсутствие АТФ (рис. 2). Как показано на примере хлорпромазина, эндогенный ΔpH , проявляющийся в виде реакции зонда на внесение СП (кривая *a*), исчезает в присутствии нейролептика (кривая *б*). В этой концентрации хлорпромазин почти полностью подавляет АТФ-зависимый H^+ -транспорт, о чем свидетельствует резкое снижение флуоресцентного ответа зонда на последующее добавление Mg -АТФ.

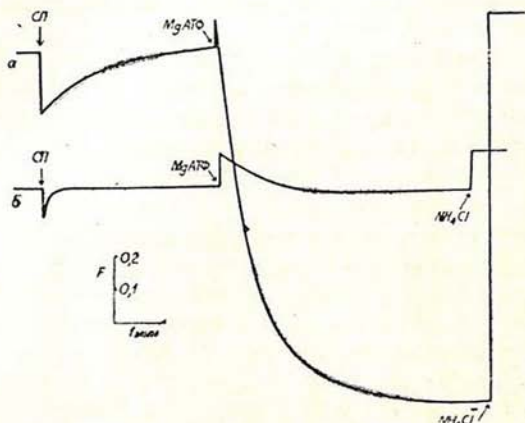


Рис. 2. Изменения флуоресценции акридиноранжа при последовательном добавлении мембран СП и Mg -АТФ. *a*—в стандартной среде измерения, *б*—в присутствии 10 мкМ хлорпромазина. Степень тушения флуоресценции зонда пропорциональна величине градиента концентраций H^+ . Небольшое повышение флуоресценции в момент добавления Mg -АТФ не связано с H^+ -транспортом [5]

Таким образом, для устранения градиента рН не требуется прямого взаимодействия нейролептиков с H^+ -насосом. Учитывая физико-химические свойства этих соединений (наличие вторичных и третичных аминогрупп) можно предположить, что механизм действия нейролептиков на градиенты рН как в отсутствие, так и в присутствии АТФ представляет собой разобщающий эффект по типу проникающих слабых оснований.

Полученные результаты показывают, что ингибирование генерации градиентов рН является общим свойством нейролептиков, представляющих различные группы—фенотиазины, бутирофеоны, алкалоид резерпин. По эффективности ингибирования они мало отличаются друг от друга, кроме дроперидола, который клинически менее эффективен и заметно слабее. Концентрации нейролептиков, при кото-

рых наблюдается ингибирование, близки к тем, которые оказывают терапевтическое действие [1]. Известные из литературы токсические эффекты обнаруживаются при более высоких концентрациях [7, 8].

Поскольку нейролептики, вероятно, действуют на H^+ -транспорт как разобщители типа слабых оснований, они, в свою очередь, должны при этом накапливаться внутри СП. Концентрации их могут оказаться весьма высокими, так как накопление должно проходить пропорционально соотношению концентраций H^+ внутри и снаружи СП, которое в обычных условиях ($\Delta pH > 2$) превосходит 100. Накапливаясь внутри СП в высоких концентрациях, нейролептики могут взаимодействовать с локализованными там нейрохимическими системами, в частности с ферментами метаболизма медиаторов или их переносчиками. Возможно, такие взаимодействия придают относительную специфичность тем или иным видам нейролептиков, обуславливая их индивидуальные различия. В пользу такого предположения свидетельствуют данные о потребности в протонном градиенте на мембране СП для связывания резерпина [9], обладающего свойствами блокатора переносчика катехоламинов в этой мембране.

NEUROLEPTICS OF DIFFERENT CLASSES ABOLISH H^+ TRANSPORT IN SYNAPTIC VESICLE MEMBRANES OF RAT BRAIN

MEL'NIK V. I., SHUKALOVA T. F., GLEBOV R. N.

Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

The effect of neuroleptics of different classes on the ATP-dependent H^+ transport (monitored using acridine orange, a fluorescent probe) in synaptic vesicle membranes of the rat brain was studied. All studied neuroleptics suppressed the active H^+ transport. According to their efficacy, they can be arranged in the following series: trifluoperazine \gg chlorpromazine \gg reserpine \gg haloperidol \gg droperidol. The corresponding IC_{50} values were 1,0; 2,2; 4,3; 7,7 and 49 μM . In the same concentration range the neuroleptics also disturbed the endogenous pH gradients observed in the absence of ATP. The suppressed H^+ transport and disturbed pH gradients appear to be due to an uncoupling effect of neuroleptics acting as permeating weak bases. Such mechanism involves the accumulation of neuroleptics inside synaptic vesicles in proportion to the transmembranes H^+ concentration gradient.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Jenner P., Marsden C. D. Clin. Pharmacol., v. 7, p. 149-16, 1985
2. Антошкин И. М., Мельник В. И., Глебов Р. Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 102, № 12, с. 714-771, 1986.
3. Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Успехи соврем. биол., т. 95, № 2, с. 225-241, 1983.

4. Johnson R. G. *Physiol. Rev.*, v. 68, № 1, p. 232—307, 1988.
5. Мельник В. И., Глебов Р. Н. *Нейрохимия*, т. 6, № 4, с. 517—530, 1987.
6. Глебов Р. Н., Мельник В. И., Титов С. Ю. *Биохимия*, т. 52, № 11, с. 1818—1828, 1987.
7. Abe K., Sakizawa T., Kogure K. *Neurosci. Letters*, v. 71, № 3, p. 335—339.
8. Munyon W. H., Salo R., Briones D. F. *Psychopharmacology*, v. 91, № 2, p. 182—188, 1987.
9. Near J. A., Mahler H. R. *FEBS Letters*, v. 158, № 1, p. 31—35, 1983.

Поступила 28. VI. 1990

M. PETERLIK, F. BRONNER. *Molecular and Cellular Regulation of Calcium and Phosphate Metabolism*. J. Wiley and Sons. Baffins Lane, Chichester, 258 p., 1990.

Молекулярная и клеточная регуляция кальция и фосфорный метаболизм

Процесс окостенения и рассасывания костной ткани протекает весьма сложными путями, в которые вовлекаются клеточная деятельность, внеклеточные структуры и изменение фазы с жидкой на твердую при формировании костной ткани и, наоборот, твердой на жидкую при резорбции кости. Настоящая книга предлагает совокупные данные новейших исследований по этим вопросам и интерпретацию механизмов регуляций указанных процессов. Она выходит в серии «Progress in Clinical and Biological Research» (т. 332) и содержит следующие главы: «Влияние пептидов, аналогичных паратиреоидным гормонам пептидов на транспорт кальция и фосфата», «Пептид, вызывающий некоторые злокачественные гиперкальцемии и играющий регуляторную роль в транспорте кальция через плаценту», «Разнообразные функции секреторного белка I», «Рецептор для кальцитонин-кальцитропного гормона», «Различные аспекты гормоноподобного действия витамина D».