

Карбамазепин – ингибитор АПФ: взаимосвязь с патогенезом височной эпилепсии

Эпилепсия – хроническое неврологическое заболевание, характеризующееся патологической нейрональной активностью и приводящее к эпилептическим судорогам. Эпилепсией страдают около 1% населения во всем мире.

Не так давно стало известно, что мутация, повышающая активность ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), чаще встречается у пациентов мужского пола с рефрактерной височной эпилепсией, а карбамазепин в свою очередь является ингибитором АПФ. В статье S.S. Almeida et al. «Carbamazepine inhibits angiotensin-I-converting enzyme, linking it to the pathogenesis of temporal lobe epilepsy», опубликованной в журнале *Translational Psychiatry* (2012; 2 (3): e93), подтверждается непосредственная взаимосвязь между эпилепсией и ренин-ангиотензиновой, калликреин-кининовой системами.

Известно, что у пациентов с височной эпилепсией обнаруживают высокую экспрессию AT1 и AT2-рецепторов ангиотензина II и рецепторов кинина B1 и B2 в головном мозге, что объединяет между собой большинство форм эпилепсии. Височная эпилепсия ассоциируется с атрофией и глиозом нейронов гиппокампа (мезиальный склероз), что коррелирует с ренин-ангиотензиновой и калликреин-кининовой системами (Arganaraz et al., 2008; Perosa et al., 2007). Эти системы связаны с регуляцией артериального давления и некоторыми функциями ЦНС. При поэтапном протеолитическом превращении ангиотензиногена под влиянием ренина в ангиотензин I последний в дальнейшем распадается под действием АПФ до ангиотензина II; кининоген под влиянием калликреина превращается в пептид брадикинин, который в свою очередь может распадаться под действием АПФ (Takahashi et al., 2003).

По причине двойственности функции фермента распада ангиотензина и кинина, была предпринята попытка изучить у пациентов, страдающих эпилепсией, частоту полиморфизма включения (I)/делеции (D) АПФ, поскольку у носителей мутации гена АПФ (включения Alu-повторов 287 п. н.) продемонстрирована меньшая активность АПФ в плазме крови (Rigat et al., 1990; Danser et al., 1995).

Обнаружено, что большинство пациентов, страдающих тяжелыми формами эпилепсии, относятся к генотипу DD (делеция). Это позволило утверждать, что активность этого фермента (уровень ангиотензина/кининов) может быть вовлечена в патогенез височной эпилепсии. Для того чтобы подтвердить эти результаты, была проверена гипотеза, согласно которой полифармакологические эффекты доступных в настоящее время препаратов могут опосредованно влиять на ингибирование АПФ. В итоге был сделан вывод о том, что карбамазепин, один из наиболее часто используемых препаратов при эпилепсии и психических расстройствах, является непосредственным ингибитором АПФ.

Материалы и методы исследования

Генотипирование

Согласно методу, описанному Almeida et al. (2010), было проведено генотипирование включения/делеции полиморфизма АПФ у 72 пациентов с эпилепсией, прошедших хирургическое лечение, и у 368 контрольных субъектов. Все участники воздерживались от приема

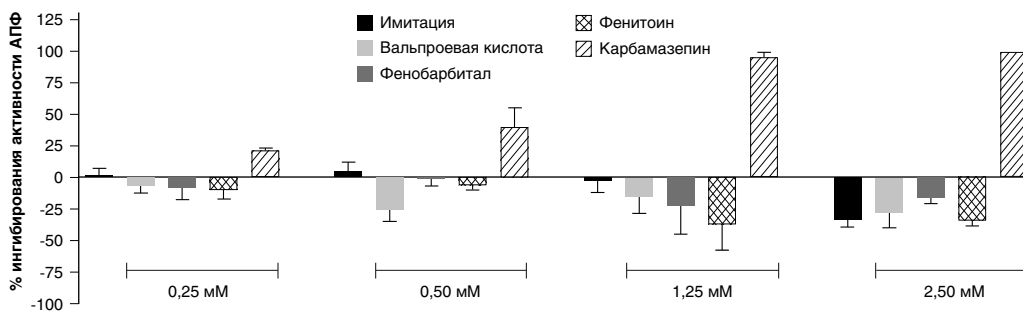
алкоголя или кофеина на протяжении, как минимум, 24 часов накануне забора анализов крови. Из исследования исключались курильщики и лица, принимавшие антигипертензивные средства. Перед началом экспериментальных процедур каждый участник давал информированное согласие на сбор ДНК.

Хирургические процедуры

Хирургические образцы у пациентов с рефрактерной эпилепсией брали с помощью стандартной кортико-амигдало-гиппокампальной эктомии, проводимой для достижения контроля над судорогами, в отделении лечения и исследования эпилепсии клиники Сан-Паулу (Бразилия). Исключались все случаи, в которых предоперационная магнитно-резонансная томография (МРТ) указывала на новообразования, патологию сосудов, посттравматические или ишемические поражения. У отобранных больных ($n = 9$) собирали подробный анамнез, проводили видео-электроэнцефалографические и МРТ-исследования. Были включены пациенты, у которых для достижения контроля над судорогами применяли карбамазепин, фенобарбитал, вальпроевую кислоту и фенитоин. Хирургическое вмешательство выполнялось, как минимум, через 48 часов после последнего судорожного припадка. Результаты хирургического лечения эпилептических судорог классифицировали согласно Engel (2001) на четыре категории. Контрольные образцы брались опытным патологоанатомом во время аутопсии мозга (менее чем через 5 часов после смерти; $n = 9$) при отсутствии сведений о патологии согласно классификации на основе обычного гистологического исследования. С помощью этой процедуры проводили сравнение одних и тех же регионов гиппокампа у пациентов с эпилепсией и при аутопсии контрольных субъектов. Извлеченные образцы гиппокампа замораживались в жидком азоте и хранились при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Анализ активности АПФ

Активность соматического АПФ гиппокампа человека анализировали с помощью флуоресцентного измерения переноса энергии субстрата, состоящего из антрапиловой кислоты (Abz) и динитрофенола (Dnp) в качестве флуоресцентных пар донор/акцептор (Abz-FRK(Dnp)P-OH) (Carmona et al., 2006). Рассчитывалась специфическая активность АПФ в каждой ткани, которая выражалась как отношение скорости в мкм/мин^{-1} к соответствующим концентрациям, определение проводилось по методу Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Активность очищенного, или АПФ плазмы (контроль: $n = 127$, височная эпилепсия: $n = 43$) определялась подобным образом, но нормализовалась либо количеством фермента, либо объемом плазмы соответственно. При анализе клеток человеческий АПФ вводили в яйцеклетки китайских хомячков, его активность оценивали с помощью флуоресцентного измерения переноса энергии субстрата Abz-FRK(Dnp)P-OH, либо анализировался эндогенный субстрат ангиотензина I методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (Duncan et al., 2006). Измерения проводили трижды, активность АПФ выражалась как мкм/мин гидролиза субстрата Abz-FRK(Dnp)P-OH после инкубации на протяжении 6 минут при применении карбамазепина. Для определения ингибирующего эффекта карбамазепина на гидролитическую активность АПФ с ангиотензином образцы предварительно инкубировались на протяжении двух часов с различными концентрациями карбамазепина. Затем образцы инкубировались в том же буфере с 10 мкм ангиотензина I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) с/без 2,5 мкм лизиноприла. Поверхностные пробы (400 мкл) собирали после 0, 2, 5, 15 и 30-й минуты, реакция останавливалась путем добавления 2 мкл 10% трифторуксусной кислоты (ТФК). Превращение ангиотензина I в ангиотензин II определяли путем анализа ВЭЖХ с использованием обратнотазовой хроматографии: октадецильные цепочки C18 ($4,6 \times 150\text{ мм}$), растворитель А (0,1% ТФК/ H_2O) и очищенный растворитель В (0,1% ТФК; 60% ацетонитрил/ H_2O), 30-45% ацетонитриловый градиент растворителя В на протяжении 15 минут с потоком $1,5\text{ мл/мин}^{-1}$ при определении длины волны 220 нм . Ряд пиков собирали и анализировали автоматическим определителем



Ингибиторный профиль препаратов, обычно применяемых для терапии эпилепсии. Карбамазепин оказался единственным противозепилептическим препаратом, способным ингибировать активность АПФ в плазме.

Рисунок. Ингибирование АПФ карбамазепином

последовательности аминокислот, чтобы подтвердить их последовательность (данные не представлены). Измерения проводили дважды, значения активности АПФ выражались как процент распада ангиотензина I в минуту на один миллиграмм общего протеина (% мин⁻¹/мг⁻¹).

Анализ калликрейна

Анализ калликрейна выполняли с помощью очищенного фермента (0,57 мкг/мл; Enzyme Research Laboratories, South Bend, IN, USA) в 50 мМ Трис-HCL буфера (pH 7,4) с использованием флуорогенного субстрата пептида Z-Phe-Arg-AMC (Almeida et al., 2010).

Экспериментальная модель

Мыши C57Bl/6 были взяты в Центре развития моделей для экспериментальной медицины и биологии Государственного университета Сан-Паулу и содержались при температуре 22 °С с циклом темнота – свет (12/12 часов) со свободным доступом животных к воде и еде. Карбамазепин вводили мышам в желудок в дозе 150 мкг/кг⁻¹. Через 60 минут животных забивали, плазму крови извлекали путем центрифугирования и сберегали при температуре –80 °С. Все эксперименты проводили в соответствии с руководством Национального института здоровья США по уходу за лабораторными животными и их применению (National Academy Press, Washington DC, 1996) после одобрения комитетом этики исследований Государственного университета Сан-Паулу.

Результаты исследования и их обсуждение

Причастность АПФ к эпилепсии определялась у пациентов мужского пола, страдавших рефрактерной височной эпилепсией. Кроме того, изучалась распространенность полиморфизма включения/делеции генотипа АПФ. Известно о меньшей активности АПФ плазмы у субъектов с генотипом ВВ. Было выявлено, что среди больных височной эпилепсией чаще встречается генотип DD (46%) по сравнению со здоровыми субъектами (27%). Параллельно с этим у пациентов с височной эпилепсией обоего пола с генотипом ВВ отмечен более высокий уровень выздоровления после кортико-амигдало-гиппокампальной эктомии. Поскольку D-форма приводит к большей экспрессии уровня АПФ, ожидалось определить большую активность АПФ у пациентов мужского пола с височной эпилепсией. Действительно, активность АПФ была выше у субъектов с DD-генотипом, чем в контрольной группе. Однако выявлена лишь незначимая тенденция к увеличению активности АПФ у пациентов с височной эпилепсией с генотипом DD. В дальнейшем, когда определялась активность АПФ в гиппокампе после проведения кортико-амигдало-гиппокампальной эктомии для достижения контроля над судорогами, у пациентов наблюдалась в два раза меньшая активность АПФ.

Поскольку эти результаты представляются противоречивыми, можно предположить, что более высокая экспрессия АПФ этиологически причастна к патогенезу височной эпилепсии,

и, возможно, ее лечение может быть связано со снижением активности АПФ. Следовательно, было решено провести биохимический анализ влияния на активность АПФ различных препаратов, которые обычно используются для терапии эпилепсии (рисунок). Все медикаменты продемонстрировали незначимый эффект на активность АПФ, за исключением карбамазепина, который оказывал влияние в зависимости от дозы. Обычно для лечения височной эпилепсии карбамазепин назначают в дозах 400-1200 мг/сут, минимальная доза составляет 400 мг/сут, что эквивалентно концентрации 0,34 мМ в крови (Duncan et al., 2006). Такой уровень концентрации способен ингибировать у человека активность АПФ в плазме приблизительно на 25%.

Для того чтобы подтвердить результаты, а также исключить артефакты, вызванные влиянием других протеаз в плазме крови, эксперимент повторили с использованием очищенного АПФ. Ингибирование АПФ карбамазепином в зависимости от дозы дополнительно подтвердилось с помощью метода ВЭЖХ для определения непосредственного распада нативного пептида ангиотензина I, продуцируемого при введении АПФ в яйцеклетки китайского хомячка. На клеточном уровне карбамазепин мог ингибировать активность АПФ приблизительно на 75%. Согласно общим данным всех независимых исследований, карбамазепин в концентрациях, которые обычно используются для лечения пациентов с височной эпилепсией, *in vitro* непосредственно ингибирует АПФ. Для того чтобы проанализировать такое действие карбамазепина *in vivo*, препарат вводили в желудок мышей в дозе 150 мкг/кг. Мышей забивали через 60 минут, затем в сыворотке крови определяли активность АПФ. Этот эксперимент также подтверждал влияние карбамазепина на снижение активности АПФ приблизительно на 25%. Кроме того, непосредственное ингибирование АПФ карбамазепином дополнительно подтверждалось у пациентов, которые при терапии височной эпилепсии принимали или не принимали карбамазепин. В этом исследовании лечение карбамазепином приводило к схожему снижению активности АПФ, такому же, как и в контрольной группе, тогда как у пациентов, не применявших карбамазепин, активность АПФ была выше. Не наблюдалось различий в показателях артериального давления в группах лечения височной эпилепсии в зависимости от приема карбамазепина.

Выводы

В головном мозге выявлены все компоненты ренин-ангиотензиновой и калликреин-кининовой систем, они регулируют такие функции, как стресс, тревога, обучение и запоминание (Paul et al., 1993; Wright, Harding, 2004). При патологических состояниях ренин-ангиотензиновая система способствует воспалительным реакциям, повышающим возбуждение нейронов, формированию рубцов глии и генерации судорог в нормальных нейрональных сетях, создавая таким образом основу для взаимосвязи между ангиотензином и эпилепсией (Vezzani, Granata, 2005; Das, 2005). Полученные результаты подтверждают данную гипотезу, поскольку выявлен большой удельный вес среди пациентов с височной эпилепсией DD-полиморфизма фенотипа АПФ, который приводит к повышенной активности этого фермента. Кроме того, обнаружено, что карбамазепин в концентрациях, используемых для терапии лиц с височной эпилепсией, является ингибитором АПФ.

Недавно сообщалось о повышенной активности AT_1 и AT_2 -рецепторов ангиотензина II, а также кининовых рецепторов B_1 и B_2 в гиппокампе. Также есть сведения, что классический ингибитор АПФ каптоприл усиливает противосудорожное действие карбамазепина (Lukawski et al., 2010). Эти результаты подтверждают значительную взаимосвязь ренин-ангиотензиновой, калликреин-кининовой систем и эпилепсии. Кроме того, предполагается, что противосудорожная активность карбамазепина обусловлена ингибированием натриевых каналов (Duncan et al., 2006). Благодаря полученным результатам, список известных средств с полифармакологическими эффектами был дополнен карбамазепином.

Подготовил Станислав Костюченко