

EGY ÚJONNAN SZINTETIZÁLT ADENOZIN ANALÓG, A HIPOXANTIN-TRICIKLÁNÓ HATÁSA IZOLÁLT PATKÁNY BAL ÉS JOBB PITVARON

Óvári Ignác¹, Szilágyi Viktória¹, Viczján Gábor¹, Lampé Nóra¹, Bege Miklós², Borbás Anikó², Herczegh Pál², Juhász Béla¹, Gesztelyi Rudolf^{1*}, Erdei Tamás¹

¹ Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

² Debreceni Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszerészi Kémia Tanszék



Absztrakt

A hipoxantin-triciklánó egy a DE GYTK Gyógyszerészi Kémia Tanszéken szintetizált adenozin analóg, melyben az adenint hipoxantin, a ribózt pedig egy kondenzált triciklikus molekuláris rész helyettesíti. Munkánk során a hipoxantin-triciklánó hatását vizsgáltuk a pitvari myocardium A₁ adenozinerg rendszerére, melynek (pozitív agonista általi) aktivációja számos protektív folyamatért, köztük negatív trop hatásokért felelős.

A vizsgálatokat hím Wistar patkányokból izolált bal pitvari fülcsén és teljes jobb pitvaron végeztük. A preparátumokat 95% O₂ és 5% CO₂ gázeleggyel szellőztetett, 36°C-os Krebs oldatot tartalmazó szervkádakban függesztettük fel 10 mN alapfeszülés mellett. A bal pitvarokat állandó frekvencián ingereltük (3 Hz; 1 ms; 1-1,5 V), míg a jobb pitvarok spontán húzódtak össze. A preparátumokon az adenozin és a hipoxantin-triciklánó inotrop és chronotrop hatását vizsgáltuk külön-külön és együtt, továbbá CPX (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine; reverzibilis A₁ adenozin receptor antagonist) hiányában és jelenlétében.

Eredményeink alapján az adenozin mind a bal, mind a jobb pitvarokon hasonló mértékű, erőteljes negatív inotrop hatást fejtett ki. A hipoxantin-triciklánó ezzel szemben mérsékelt pozitív inotrop hatást váltott ki, ami hasonló mértékű volt a jobb és a bal pitvarokon. Az inotropia alakulásával összhangban, az adenozin markánsan negatív, míg a hipoxantin-triciklánó kismértékben pozitív chronotrop hatásúnak bizonyult a jobb pitvarokon. A CPX erősen (és szignifikánsan) gátolta az adenozin hatásait, de csak kisebb mértékű (és nem szignifikáns) gátlást hozott létre a hipoxantin-triciklánó hatásaival szemben. A hipoxantin-triciklánó hatásai teljes mértékben áttörhetőek voltak adenzinnal. Mindezek háttérében felvethető, hogy az adenozin könnyen le tudja szorítani a hipoxantin-triciklánót az A₁ adenozin receptorról, de (ehelyett vagy emellett) elképzelhető, hogy a hipoxantin-triciklánó az A₁ adenozin receptortól független útvonalon is hat. A hipoxantin-triciklánó tehát feltehetően a myocardialis A₁ adenozin receptor reverzibilis, ortosztérikus, inverz agonistája, melynek ugyanakkor más támadáspontja is lehet a myocardiumban.

Kulcsszavak: adenozin, hipoxantin-triciklánó, A₁ adenozin receptor, szív, pitvar, inotrop, chronotrop

THE EFFECT OF HYPOXANTHINE-TRICYCLANO, A NEWLY SYNTHETIZED ADENOSINE ANALOGUE, ON RAT LEFT AND RIGHT ATRIA

Abstract

The hypoxanthine-tricyclano is a new adenosine analogue, in which adenine and ribose are replaced by hypoxanthine and a fused tricyclic moiety, respectively, synthesized in the Department of Pharmaceutical Chemistry (Faculty of Pharmacy, University of Debrecen). In the current study, we investigated

* A levelező szerző elérhetősége: Debreceni Egyetem, ÁOK, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet; 4032 Debrecen, Nagyerdei krt. 98.; gestelyi.rudolf@pharm.unideb.hu

the effect of hypoxanthine-tricyclano on the A_1 adenosinergic system of the rat atrial myocardium, activation of which (by a positive agonist) is responsible for several protective actions, including negativeotropic effects.

The left atrial auricle and the whole right atrium were isolated from male Wistar rats and mounted at 10 mN resting tension in 10 mL vertical organ chambers containing Krebs solution (36 °C) oxygenated with 95% O_2 and 5% CO_2 . Left atria were paced (3 Hz, 1 ms, 1-2 V), while right atria worked spontaneously. The inotropic and chronotropic effects of adenosine and hypoxanthine-tricyclano were investigated (separately and in combination), in the absence and presence of CPX (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine), a reversible A_1 adenosine receptor antagonist.

Adenosine elicited a strong negative inotropic effect on both the left and right atria (to a similar extent). In contrast, hypoxanthine-tricyclano produced a moderate positive inotropic effect in the left and right atria (also to a similar extent). In consistent with the inotropic effects, adenosine exerted a substantial negative chronotropic effect, and hypoxanthine-tricyclano elicited a slight positive chronotropic effect in the right atria. CPX strongly (and statistically significantly) blunted the effects of adenosine but it produced only a minor (and not significant) inhibition against actions of hypoxanthine-tricyclano. In addition, the effects of hypoxanthine-tricyclano were completely surmountable with adenosine. This can be explained by supposing that adenosine can easily displace hypoxanthine-tricyclano from their receptor, and, alternatively or in addition, that hypoxanthine-tricyclano may also act in a pathway independent from the A_1 adenosine receptor. Thus, hypoxanthine-tricyclano is probably a reversible, orthosteric, inverse agonist of the myocardial A_1 adenosine receptor that might also have another target in the myocardium.

Keywords: adenosine, hypoxanthine-tricyclano, A_1 adenosine receptor, heart, atrium, inotropic, chronotropic

BEVEZETÉS

A szív- és érrendszer megfelelő működése nélkülözhetetlen az élet és a jó életminőség fenntartásában. A cardiovascularis rendszert érintő diszregulatív folyamatok következménye például a magasvérnyomás betegség és az ezzel szorosan összefüggő stroke és szívinfarktus. A szív- és érrendszeri betegségek évente 3,9 millió áldozatot követelnek Európában, ami a halálesetek 45%-át teszi ki. Az ischaemiás szívbetegség és a stroke halálozási aránya magasabb Közép- és Kelet-Európában, mint a kontinens más régióban.¹ Ezen adatok ismeretében elmondhatjuk, hogy különösen fontos olyan új vegyületek szintézise, melyek szerepet kaphatnak a szív- és érrendszeri megbetegedések kezelésében, továbbá lényeges a más céllal fejlesztett molekulák esetleges cardiovascularis hatásainak feltárása is. A szervezetben általánosan előforduló adenosin (adenin-ribozid) magában hordozza azt a potenciált, hogy újonnan kifejlesztett farmakonok kiindulási vegyülete vagy „sablonja” legyen.²⁻³ Maga az adenosin is alkalmas a szívinfarktus és a supraventricularis tachycardia akut ellátására, alkalmazása azonban nem terjedt el széles körben igen rövid féléletideje miatt.⁴⁻⁵

Az adenosin celluláris stressz (hypoxia, ischaemia, gyulladás) esetén halmozódik fel a szövetekben és elsősorban saját receptoraihoz kötődve fejti ki hatását. Az adenosin receptor családnak a Nemzetközi Farmakológiai Társaság (IUPHAR) osztályozása szerint három típusa van (az egyik típuson belül pedig két altípus különíthető el): A_1 , A_{2A} , A_{2B} és A_3 . Mind a négy receptor 7 transzmembrán doménnal rendelkezik és G protein-kapcsolt.⁶⁻⁷ A legjelentősebb adenosin receptor típus a szívben is jelen lévő A_1 adenosin receptor (A_1 receptor), amely döntően protektív és regeneratív hatásokat mediál.^{6,8-9} Az A_1 receptorok fontos szerepet játszanak a cardiovascularis szabályozásban, ezért olyan új gyógyszer csoportok célpontjai, amelyek terápiás potenciállal rendelkeznek egyes szív- és érrendszeri rendellenességek kezelésében. Ha jobban megértjük ezen receptorok működési mechanizmusait, képesek lehetünk jobban használható adenosin receptor ligandokat kifejleszteni.¹⁰

Az adenosin sokrétű hatást gyakorol a szívre, ezek közé tartozik a pacemaker sejtek aktivitásának csökkentése és a pitvar-kamrai csomó ingerületvezetésének gátlása (negatív chronotrop hatások),

valamint a szívizom, különösen a pitvari myocardium kontraktilitásának csökkentése (negatív inotrop hatás). Az adenzin ezen hatásaiért főként az A₁ receptor a felelős.¹⁷

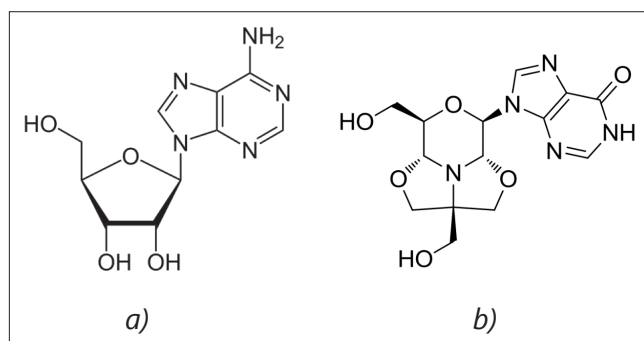
A pitvari szívizomban az A₁ adenzinerg rendszer aktivációja – elsősorban G_i és G_o fehérjék közvetítésével – adenilcikláz gátláshoz és a cAMP-szint csökkenéshez vezet. Ez a nodális szöveteken gátolja a ciklikus nukleotid függő I_f csatornák nyitását (csökkentve a „funny” áramot), emellett nyitja a K⁺ csatornákat (ezzel hiperpolarizálva a sejtet).^{2,12} Az adenzin ezáltal gátolja a pacemaker áramot a sinuscsomó és pitvar-kamrai nodális sejtekben, továbbá visszafogja az L-típusú Ca²⁺ csatorna működését.¹³ Ezen hatások összessége, hogy a diasztolés depolarizáció megnyúlik, ami negatív chronotrop hatást eredményez.

Az A₁ receptor aktiváció a munkaizomrostokon is gátolja az adenilcikláz és nyitja a K⁺ csatornákat, ami összességében csökkenti a citoszól szabad Ca²⁺ szintjét az akciós potenciál platófázisában. Az adenzin ezen hatásai segítségével váltja ki negatív inotrop hatását (elsősorban a pitvaron [1. ábra]).

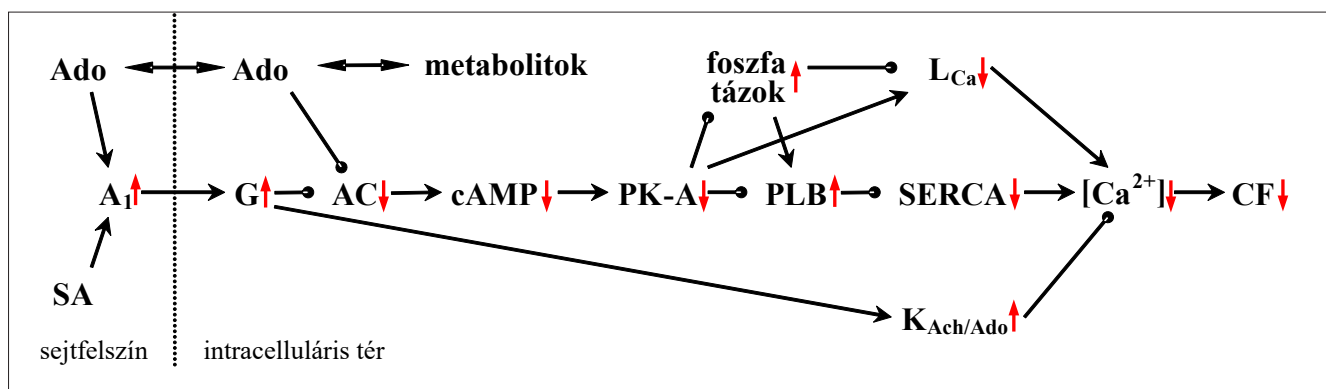
Az adenzin a humán gyógyászatban antiarrhythmias szerként szerepel, de rövid (10 s körüli) féléletideje miatt – biztonságossága mellett – nem tartozik a leghatékonyabb farmakonok közé, így ritkán használják. Alkalmazásának másik hátránya, hogy túl sok helyen hat, mivel az adenzin receptorok szinte minden szöveten

megtalálhatóak. Ezen problémák megoldására számos analógot szintetizáltak, melyek farmakokinetikai és farmakodinamias tulajdonságai kedvezőbbek az adenzinénál (lassabban eliminálódnak, továbbá típus illetve altípus szelektívek). Ezek közül van, amelyik már forgalomba került (pl. az A_{2A} receptor agonista regadenoson), de a legtöbb adenzin analóg még mindig fejlesztés illetve klinikai kipróbálás alatt áll. A szintetikus analógok antiarrhythmias, fájdalomcsillapító, gyulladáscsökkentő vagy antivirális hatásokkal rendelkeznek, de befolyásolhatják egyes immunbetegségek (pl. a rheumatoid arthritis) kimenetelét is.^{3,17-22}

A Debreceni Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszerészi Kémia Tanszéken a purin és cukor komponensből álló adenzin molekula mindkét alkotóelemét módosították. A hipoxantin-triciklánóban az adenint hipoxantin, a ribózt pedig egy morfolínóból kiinduló, kondenzált triciklusos molekularész helyettesíti (2. ábra).



2. ábra. Az adenzin (a) és hipoxantin-triciklánó (b) szerkezete¹⁶



1. ábra. Az adenzin és egy tipikus szintetikus A₁ receptor agonista kontrakciós erőt befolyásoló főbb jelátviteli útjai pitvari munkaizomsejten. Ado: adenzin; SA: szintetikus agonista; A₁: A₁ adenzin receptor; metabolitok: az adenzin metabolitjai; G: G protein; AC: adenilcikláz; cAMP: 3',5'-ciklikus adenzin monofoszfát; PK-A: cAMP-függő protein kináz A; PLB: foszfolambán; SERCA: a szarkoplazmatikus retikulum Ca²⁺-ATP-áza; foszfatázok: intracelluláris foszfatázok; L_{Ca}: L-típusú Ca²⁺ csatorna; K_{Ach/Ado}: muszkarin aktiválta K⁺ csatorna; [Ca²⁺]: a citoszól Ca²⁺ koncentrációja az akciós potenciál platófázisában; CF: kontrakciós erő; hegyes nyíl: serkentés vagy növelés; pontvégű nyíl: gátlás vagy csökkentés; ↑: aktiválódás vagy növekedés; ↓: gátlódás vagy csökkenés, melyet az A₁ receptor agonista okoz az adott struktúrán¹⁴⁻¹⁵

A hipoxantin az adenin dezaminálásával keletkező (az élőlényekben, így az emberi szervezetben is előforduló) purinvázis bázis, melyben a 6. szénatomhoz kapcsolódó amino-csoportot hidroxilcsoport helyettesíti (ami enol-oxo tautóméria miatt oxo-csoport is lehet).²³ A morfolinók a nitrogén-tartalmú gyűrűvel rendelkező azanukleozidok speciális csoportját képezik.²⁴ Alapvázát tekintve a hipoxantin-triciklánó adenzin analógnak tekinthető.¹⁶

Jelen vizsgálataink célja az volt, hogy kiderítsük, a hipoxantin-triciklánó kötődik-e az A_1 receptorhoz, továbbá, hogy felfedjük esetleges hatását a pitvari kontraktilitásra, valamint a pitvari chronotrop működésre.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Anyagok

Az általunk használt vegyszerek: hipoxantin-triciklánó, amit a Debreceni Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszerészi Kémia Tanszéken állítottak elő; továbbá adenzin (nem szelektív, reverzibilis adenzin receptor agonista) és CPX (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine; szelektív, reverzibilis A_1 receptor antagonist), melyeket a Sigma-tól (St. Louis, MO, USA) vásároltunk.

Az adenzint és a hipoxantin-triciklánót 36 °C-os módosított Krebs-Henseleit pufferben (Krebs oldat) oldottuk fel. A CPX oldása dimetilszulfoxidban (DMSO) történt. A törzsoldatok 10 mM-os koncentrációban készültek.

Az adenzin és a hipoxantin-triciklánó törzsoldat hígítására Krebs oldatot használtunk, melynek az összetétele (mM-ban): NaCl: 118, KCl: 4.7, $CaCl_2$: 2.5, NaH_2PO_4 : 1, $MgCl_2$: 1.2, $NaHCO_3$: 24.9, glükóz: 11.5, aszkorbinsav: 0.1.

2.2. Preparátumok és eszközök

A jobb és a bal pitvarokat hím Wistar patkányokból izoláltuk. Az állatok tartása, előkezelése és feldolgozása összhangban volt a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottságának Etikai Kódexével és a vonatkozó Európai Unió előírásokkal (etikai engedély száma: 25/2013 DEMÁB).

A patkányokat dekapitáltuk, majd a mellkasfal elülső részét megnyitva a szívet kivágtuk, a csúcsánál fogva kiemeltük és a szívcsúcs levágásával 4-5 °C-os Krebs oldatba ejtettük, melyet előtte 10 percen át 95% O_2 -t és 5% CO_2 -ot tartalmazó gázzal (karbogén) buborékolattunk. A szív leállása után először a bal pitvari fülcsét vágtuk le (a továbbiakban: bal pitvar), majd egyben izoláltuk a pitvarok maradék részét, vagyis a teljes jobb pitvart és a bal pitvar fülcsén kívüli részét (a továbbiakban: jobb pitvar). A jobb pitvarról kíméletesen eltávolítottuk a nagyerek maradványait.

Mind a bal, mind a jobb pitvarokat 10 ml térfogatú, vertikális állású, Krebs oldattal (36 °C, pH 7,4) feltöltött és karbogénnel folyamatosan buborékolattott szervkádakban függesztettük fel a következő módon: a fülcse csúcsát fonállal a teflon szervtartó alsó részéhez rögzítettük, a szervtartót a szervkádba helyeztük, majd a fülcse azon pontját, amelyik a legtávolabb volt a fülcse csúcsától, transzducer karjához rögzítettük.

A bal pitvarokat platinaelektrodon keresztül ingereltük (3 Hz frekvencián, 1 ms impulzusszélességgel és 1-1,5 V feszültséggel) programozható stimulátor (ST-02, Experimetria, Budapest) és erősítő (PST-02, Experimetria, Budapest) segítségével (a jobb pitvarok spontán működtek). A pitvarok izometrikus kontrakciós erejét transzducerrel (SD-01, Experimetria, Budapest) és jelerősítővel (SG-01D, Experimetria, Budapest) alakítottuk elektromos jellé, majd hőirókaros poligráffal (R-61 6CH, Medicor, Budapest) vizualizáltuk hőérzékeny papírra.

A preparátumokat 10 mN alapfeszülésre állítottunk be. Az alapfeszülést a koncentráció-hatás (E/c) görbék felvételét követő mosás végén mindig 10 mN-ra állítottuk vissza, hogy a következő E/c görbe az előzővel összevethető eredményt adjon.

2.3. Protokoll

A szervkádakba függesztett preparátumokat először 45 percig inkubáltuk Krebs oldatban. Ezután kumulatív E/c görbét vettünk fel adenzinnal (1 nM - 1 mM; „Ado görbe”), majd 15 perc mosás következett Krebs oldattal. Ezt követően minden pitvaron két protokoll (P1, P2) egy-két hajtottuk végre.

P1 (n=14): A pitvarokon kumulatív E/c görbét vettünk fel hipoxantin-triciklánóval (1 nM - 300 µM; „HT görbe”), amit mosás nélkül egy kumulatív adénózin E/c görbe követett (1 nM - 1 mM; „Ado+HT görbe”).

P2 (n=10): A pitvarokhoz 10 µM CPX-et adtunk, majd 10 perc inkubációt követően kumulatív adénózin E/c görbét vettük fel (1 nM - 1 mM; „Ado+CPX görbe”). Ezután 10 perc mosás következett Krebs oldattal, majd újabb 10 perc inkubáció 10 µM CPX jelenlétében, végül kumulatív E/c görbét vettünk fel hipoxantin-triciklánóval (1 nM - 300 µM; „HT+CPX görbe”).

2.4. A mérési adatok kiértékelése

Az inotropia vizsgálatakor az egymást követő összehúzóadások alsó (minimum) és a felső (maximum) burkológörbéjének távolságát tekintettük a kontrakciós erőnek. Az inotrop hatást a kontrakciós erő változásából számoltuk ki.

$$E = \frac{F - F_0}{F_0} \times 100\% \quad (1)$$

E : inotrop hatás; F : az adott farmakon beadása után mért kontrakciós erő; F_0 : a kiindulási kontrakciós erő. Negatív inotrop hatás esetében a farmakon beadása után mért legkisebb kontrakciós erőt vettük alapul, míg pozitív inotrop hatásnál a farmakon által kiváltott legnagyobb kontrakciós erőt használtuk a számítás során.

A chronotropia vizsgálatakor a regisztrátum papírfutási sebességének ismeretében először a „pulzusszámot” (HR) határoztuk meg:

$$HR = 8,82 \frac{mm}{s} \times \frac{x}{50 mm} \times 60 \frac{s}{min} \quad (2)$$

8,82 mm/s: a papírfutási sebesség; x : az összehúzóadások száma a regisztrátum egy 50 mm-es szakaszán. Negatív chronotrop hatás esetében a farmakon beadása után mért legkisebb frekvenciájú 50 mm-es szakaszt választottuk ki, pozitív chronotrop hatásnál pedig a legnagyobb frekvenciájút.

A chronotrop hatást (E) a kiindulási pulzusszámból (HR_0) és a farmakon adott koncentrációja jelenlétében kialakuló pulzusszámból (HR) kaptuk meg:

$$E = \frac{HR - HR_0}{HR_0} \times 100\% \quad (3)$$

2.5. Statisztikai elemzés

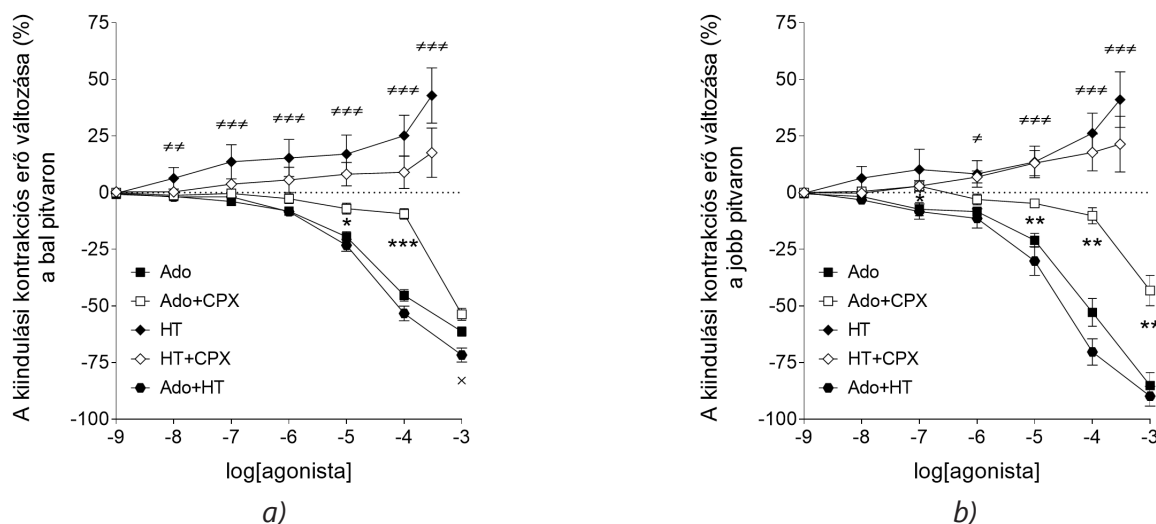
Az adatok eloszlásának normalitását Shapiro-Wilk teszttel ellenőriztük. Két normális eloszlású adathalmazt párosítatlan t-teszttel hasonlítottunk össze (ha az F-teszt szignifikánsan eltérő varianciákat jelzett, Welch korrekció alkalmazásával). Kettőnél több normális eloszlású adathalmaz összehasonlításához egyszempontú ANOVA-t és Tukey poszt-tesztet használtunk. A normalitás hiányában két adathalmazt Mann-Whitney teszttel, kettőnél többet Kruskal-Wallis teszttel és Dunn poszt-teszttel hasonlítottunk össze. A statisztikai elemzés GraphPad Prism 8.4.2 for Windows szoftver segítségével készült.

3. EREDMÉNYEK

3.1. A bal és jobb pitvarok inotrop válasza

Az adénózin mind a bal, mind a jobb pitvarokon erőteljes negatív inotrop hatást fejtett ki, melyek nem különböztek egymástól szignifikánsan (3. ábra). Az adénózin 10 és 100 µM koncentrációira adott válasz szignifikánsan kisebb volt CPX jelenlétében, mint a CPX nélkül, 1 mM koncentrációban azonban az adénózin (a bal pitvaron szinte teljesen, a jobb pitvaron részlegesen) áttörte a reverzibilis antagonistá CPX blokádját (3. ábra).

Az előzőekben tapasztaltakkal szemben, a hipoxantin-triciklánó – átlagosan – mérsékelt pozitív inotrop hatást váltott ki mind a bal, mind a jobb pitvaron, melyek nem különböztek szignifikánsan egymástól (de szignifikánsan eltértek az adénózin hatásától). A hipoxantin-triciklánó hatásához tartozó szórás lényegesen nagyobb volt, mint az adénózin esetében. A CPX jelenléte a hipoxantin-triciklánó hatását is gyengítette, azonban ez a hatáscsökkenés nem volt szignifikáns, feltehetően a hipoxantin-triciklánó által kiváltott válaszok nagy szórása miatt (az adénózinra adott válaszokhoz képest [3. ábra]).



3. ábra. Az adenosin és a hipoxantin-triciklánó hatása a bal pitvar (a) és a jobb pitvar (b) kontrakciós erejére (átlag ± SEM). Az x tengelyen az agonista koncentrációk (mol/l) 10-es alapú logaritmusát tüntettük fel, míg az y tengelyen a kiindulási kontrakciós erő százalékos változását. A 0% a kiindulási kontrakciós erőt jelzi, a -100% a pitvar leállását, a 75% pedig a kiindulási kontrakciós erő 75%-kal való (azaz 1.75-szeres) növekedését. Ado: adenosin E/c görbe; Ado+CPX: 10 µmol/l CPX jelenlétében felvett adenosin E/c görbe; HT: hipoxantin-triciklánó E/c görbe; HT+CPX: 10 µmol/l CPX jelenlétében felvett hipoxantin-triciklánó E/c görbe; Ado+HT: 411 µmol/l hipoxantin-triciklánó jelenlétében felvett adenosin E/c görbe; SEM: standard error of the mean. Összehasonlítás: #: HT vs. Ado; *: Ado+CPX vs. Ado; x: Ado+HT vs. Ado (1 jel: p < 0,05; 2 jel: p < 0,01; 3 jel: p < 0,001)

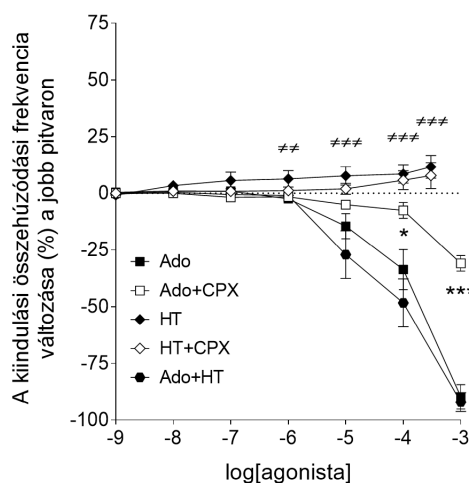
A kb. 411 µM hipoxantin-triciklánó jelenlétében felvett adenosin E/c görbe (Ado+HT görbe) csak a bal pitvaron és 1 mM koncentráció esetén különbözött szignifikánsan a hipoxantin-triciklánó nélküli adenosin E/c görbétől (Ado görbe), ahol is – érdekes módon – az Ado+HT görbe mutatott nagyobb negatív inotrop választ (3. ábra).

3.2. A jobb pitvari chronotrop válasz

A chronotrop válasz az inotrop válasszal összhangban alakult. Az adenosin negatív chronotrop hatást fejtett ki a spontán működő jobb pitvarokra. Az adenosin negatív inotrop hatásával összehasonlítva a negatív chronotropia gyengébb volt kis és közepes adenosin-szinteknél, 1 mM-nál viszont elérte a negatív inotropiánál tapasztalt mértéket (4. ábra).

A CPX szignifikánsan gátolta az adenosin kiváltotta negatív chronotropiát. A hipoxantin-triciklánó - átlagosan - enyhe pozitív chronotrop hatást fejtett ki a jobb pitvaron, ami szignifikánsan különbözött az adenosin negatív chronotrop hatásától. A CPX csökkentette a hipoxantin-triciklánó hatását, ez azonban nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét. 411 µM hipoxantin-triciklánó jelenléte nem befolyásolta szignifikánsan az adenosin chronotrop hatását (4. ábra).

A CPX szignifikánsan gátolta az adenosin kiváltotta negatív chronotropiát. A hipoxantin-triciklánó - átlagosan - enyhe pozitív chronotrop hatást fejtett ki a jobb pitvaron, ami szignifikánsan különbözött az adenosin negatív chronotrop hatásától.



4. ábra. Az adenosin és a hipoxantin-triciklánó hatása a jobb pitvari chronotropiára (átlag ± SEM). Az x tengelyen az agonista koncentrációk (mol/l) 10-es alapú logaritmusát tüntettük fel, míg az y tengelyen a spontán kiindulási frekvencia százalékos változását. A 0% a kiindulási frekvenciát jelzi, a -100% a pitvar leállását, a 75% pedig a frekvencia 75%-kal való (azaz 1.75-szeres) növekedését. Ado: adenosin E/c görbe; Ado+CPX: 10 µmol/l CPX mellett felvett adenosin E/c görbe; HT: hipoxantin-triciklánó E/c görbe; HT+CPX: 10 µmol/l CPX mellett felvett hipoxantin-triciklánó E/c görbe; Ado+HT: 411 µmol/l hipoxantin-triciklánó jelenlétében felvett adenosin E/c görbe; SEM: standard error of the mean. Összehasonlítás: #: HT vs. Ado; *: Ado+CPX vs. Ado (1 jel: p < 0,05; 2 jel: p < 0,01; 3 jel: p < 0,001).

A CPX csökkentette a hipoxantin-triciklánó hatását, ez azonban nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét. 411 μ M hipoxantin-triciklánó jelenléte nem befolyásolta szignifikánsan az adenzin chronotrop hatását (4. ábra).

4. KÖVETKEZTETÉSEK

A purinerg, azon belül az adenzinerg transzmisszió egyike a szervezet legősibb és legáltalánosabb szabályozó mechanizmusainak. Az adenzin számos jelátviteli útvonalon keresztül fejt ki hatásait, melyek alapvetően protektív és reparatív szerepet töltenek be a szervezet működésében.^{6,10,25-28} A kísérleteinkhez használt pitvari myocardiumon elsősorban az A_1 adenzin receptor típus fejeződik ki, ami G_i és G_o fehérjéhez kapcsolódva a cAMP szintjének csökkentésén és a kifelé menő K^+ -áram növelésén keresztül negatív trop hatásokat mediál.^{10,27} A szív adenzinerg rendszerére vonatkozó kutatások iránymutatóak lehetnek az egyes cardiovascularis megbetegedések (különösen az ischaemiás szívbetegség és egyes supraventricularis arrhythmia) terápiájára szánt gyógyszerek fejlesztésében.³

Az ismert kiindulási adenzinerg vegyületek módosításával sok potenciális indikációs területen számíthatunk hatékony új analógokra, amelyek alkalmazhatóak lehetnek, mint antiarrhythmias, fájdalomcsillapító, gyulladáscsökkentő, vagy antivirális hatóanyagok.^{18,29-34} A hipoxantin-triciklánó az adenzin újonnan szintetizált szerkezeti analógja, melyben a ribózt egy morfolinóból kiinduló triciklikus kondenzált gyűrű, az adenint pedig hipoxantin helyettesíti. A hipoxantin-triciklánót antivirális szernek szánták, melyet ilyen irányban teszteltek is.¹⁶ Jelen kísérletünk célja a hipoxantin-triciklánó esetleges cardialis hatásának feltárása volt patkány bal és jobb pitvaron.

Eredményeink szerint a hipoxantin-triciklánó mérsékelt pozitív inotrop hatást fejtett ki mind a bal, mind a jobb patkány pitvaron, továbbá ezzel összhangban enyhe pozitív chronotrop hatása is volt a jobb pitvaron. Mindkét hatás gátolhatóan tűnt CPX-szel (ortosztérikus, reverzibilis A_1 receptor antagonist), a hatások szeszélyessége (ami nagy szórásban nyilvánult meg) miatt azonban a gátlás nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét (3-4. ábra). Ez azért sajnálatos, mert a CPX-szel

való gátolhatóság arra nézve ad farmakológiai bizonyítékot, hogy a hipoxantin-triciklánó az A_1 receptor ortosztérikus kötőhelyéhez kapcsolódva váltja-e ki a pozitív trop hatásokat. Mivel az A_1 adenzinerg rendszer adenzin (vagyis az endogén agonista) általi aktivációja negatív trop hatásokat eredményez, ha a hipoxantin-triciklánó az A_1 receptor mediálásával vált ki pozitív trop hatásokat, akkor inverz agonistának tekinthető. A jelenlegi eredményeink birtokában a hipoxantin-triciklánó ortosztérikus, reverzibilis, inverz agonista jellege valószínűsíthető, de nem jelenthető ki teljes bizonyossággal.

Érdekes, hogy a hipoxantin-triciklánó jelenlétében felvett adenzin E/c görbék hasonló lefutásúak voltak, mint az analóg hiányában kivitelezett adenzin E/c görbék (3-4. ábra). Ha a hipoxantin-triciklánó az A_1 receptoron keresztül fejt ki a hatását, akkor ez a jelenség arra utalhat, hogy az analóg lényegesen kisebb affinitással kapcsolódik a receptorhoz, mint az adenzin, ezért onnan könnyen leszorítható. Figyelemre méltó továbbá, hogy hipoxantin-triciklánó jelenlétében az adenzin inkább nagyobb, mint kisebb negatív inotrop hatást tudott kiváltani, mint önmagában (3-4. ábra). Ebből kiindulva felvethető, hogy a hipoxantin-triciklánó rendelkezik egy A_1 receptoron kívüli szignalizációs – esetleg metabolikus – útvonallal is, ami – az A_1 receptoron keresztül mediálódó útvonal mellett – hozzájárulhat pozitív trop hatásaihoz. Mivel az alternatív útvonal révén kifejlődött pozitív inotropia és chronotropia legyűréséhez az adenzinnak nem kell kompetitálnia a hipoxantin-triciklánóval az A_1 receptoron, ugyanakkor a nyugalmi állapothoz képest fokozott kontraktilitás és frekvencia nagyobb teret enged a negatív trop hatásoknak, ez megmagyarázná a nagyobb adenzin hatásokat az analóg jelenlétében. Ez az alternatív útvonal egyben magyarázhatja a hipoxantin-triciklánó CPX általi gátolhatóságának (az adenzinhez képesti) kisebb mértékét is.

Noha a jobb és bal pitvari kontraktilitás változásai összhangban álltak egymással, a jobb pitvaron kapott eredmények nagyobb szórást mutattak, mint a bal pitvariak (3. ábra). Ez azt mutatja, hogy az állandó frekvencián ingerelt bal pitvar megbízhatóbb modellje az inotropia vizsgálatának, mint a spontán működő jobb pitvaré.

Összeségében elmondhatjuk, hogy az adenzin analóg hipoxantin-tricklánó pozitív ino- és chronotrop hatásokat vált ki a patkány bal és jobb pitvari preparátumokon. Viselkedése és annak CPX-szel való gátolhatósága alapján valószínűleg

rendelkezik ortosztérikus, reverzibilis, inverz A₁ receptor agonista tulajdonsággal. Emellett elképzelhető, hogy az előbb említett sajátossága mellett valamilyen más módon is fokozza a szív ino- és chronotrop működését.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A közlemény a Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-19-3 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programja (egyedi pályázati azonosító: ÚNKP-19-3-I-DE-308) támogatásával készült. A közlemény a TKP2020-NKA-04 számú projekt keretében, az Innovációs és Technológiai Minisztérium Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból nyújtott támogatásával, a 2020-4.1.1-TKP2020 pályázati program finanszírozásában valósult meg.

ÖSSZEFÉRHETLENSÉGI NYILATKOZAT

Nincs összeférhetlenség.

IRODALOM

1. *Wilkins E, Wilson L et al.* European Cardiovascular Disease Statistics 2017. Brussels: European Heart Network; 2017. p.11-51
2. *Fredholm BB.* Adenosine receptors as drug targets. *Exp Cell Res.* 2010;316:1284-1288.
3. *Szentmiklosi AJ, Cseppento A, Harmati G, Nanasi PP.* Novel trends in the treatment of cardiovascular disorders: site- and event- selective adenosinergic drugs. *Curr Med Chem.* 2011;18:1164-1187
4. *Rankin AC, Brooks R, Ruskin JN, McGovern BA.* Adenosine and treatment of supraventricular tachycardia. *Am J Med.* 1992;92:655-64
5. *Szentmiklosi AJ, Galajda Z et al.* The Janus face of adenosine: antiarrhythmic and proarrhythmic actions. *Curr Pharm Des.* 2015;21:965-976.
6. *Fredholm BB, IJerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J.* International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.* 2001;53:527-52.
7. *Fredholm BB, IJerman AP, Jacobson KA, Linden J, Müller CE.* International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors - an update. *Pharmacol.Rev.* 2011;63:1-34.
8. *Headrick JP, Peart JN, Reichelt ME, Haseler LJ.* Adenosine and its receptors in the heart: regulation, retaliation and adaptation. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1808:1413-1428
9. *Headrick JP, Ashton KJ, Rosemeyer RB, Peart JN.* Cardiovascular adenosine receptors: expression, actions and interactions. *Pharmacol Ther.* 2013;140:92-111
10. *Geldenhuys WJ, Hanif A, Yun J, Nayeem MA.* Exploring adenosine receptor ligands: potential role in the treatment of cardiovascular diseases. *Molecules.* 2017;22:917.
11. *Belardinelli L, Linden J, Berne RM.* The cardiac effects of adenosine. *Prog Cardiovasc Dis.* 1989;32:73-97.
12. *DiFrancesco D.* The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ Res.* 2010;106:434-446
13. *Belardinelli L, Shryock JC, Song Y, Wang D, Srinivas M.* Ionic basis of the electro physiological actions of adenosine on cardiomyocytes. *FASEB J.* 1995;9:359-365.
14. *Gesztelyi R, Zsuga J, Hajdu P, Szabo JZ, Cseppento A, Szentmiklosi AJ.* Positive inotropic effect of the inhibition of cyclic GMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE2) on guinea pig left atria in eu- and hyperthyroidism. *Gen Physiol Biophys.* 2003;22:501-13
15. *Kiss ZM.* Az A₁ adenzin receptor tiroxinallal szembeni érzékenységének és a direkt negatív inotrop hatásához tartozó receptor rezervjének meghatározása tengerimalac pitvaron. [Internet] 2013. szeptember 12. [cited 2020 May 13] Available from: <https://dea.lib.unideb.hu/dea/handle/2437/173155>
16. *Kicsak M.* Új heterotriciklust tartalmazó nukleozid analógok szintézise. [Internet] 2018. április 23. [cited 2020 May 16.] Available from: <https://dea.lib.unideb.hu/dea/handle/2437/249958>
17. *Elzein E, Zablocki J.* A₁ adenosine receptor agonists and their potential therapeutic applications. *Expert Opin Investig Drugs.* 2008;17:1901-1910.
18. *Samsel M, Dzierzbicka K, Trzonkowski P.* Adenosine, its analogues and conjugates. *Postepy Hig Med Dosw.* 2013;67:1189-203
19. *Jordheim LP, Durantel D, Zoulim F, Dumontet C.* Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12:447-464.
20. *Lubecka-Pietruszewska K, Kaufman-Szymczyk A, Stefanska B, Cebula-obrzutt B, Smolewski P, Fabianowska-Majewska K.* Clofarabine, a novel adenosine analogue, reactivates DNA methylation-silenced tumour suppressor genes and inhibits cell growth in breast cancer cells. *Eur J Pharmacol.* 2014;723:276-287
21. *Burnstock G, Pelleg A.* Cardiac purinergic signalling in health and disease. *Purinergic Signal.* 2015;11:1-46.
22. *Deng Y, Zhang N et al.* Adenosin Analog NITD008 is a potent inhibitor of Zika virus. *Open Forum Infect Dis.* 2016;3:ofw175
23. *Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR.* DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Nat Acad Sci U.S.A.* 1992;89:3030-3034.
24. *Summerton J, Weller D.* Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense and Nucleic Acid Drug Dev.* 1997;7:187-195.
25. *Burnstock G.* Purinergic signaling - An overview. In *Novartis Foundation Symposium.* 2006;276:26-48.
26. *Hasko G, Csoka B, Pacher P.* A2B adenosine receptors in immunity and inflammation. *Trends Immunol.* 2009;30:263-270.
27. *Sousa JB, Diniz C.* The adenosinergic system as a therapeutic target in the vasculature: New ligands and challenges. *Molecules.* 2017;22:752.
28. *Reiss AB, Grossfeld D et al.* Adenosine and the cardiovascular system. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2019;19:449-464
29. *Haas HL, Selbach O.* Functions of neuronal adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000;362:375-81.
30. *Tabrizchi R, Bedi S.* Pharmacology of adenosine receptors in the vasculature. *Pharmacol Ther.* 2001;91:133-47.
31. *Wardas J.* Neuroprotective role of adenosine in the CNS. *Pol J Pharmacol.* 2002;54:313-26.
32. *Riksen NP, Rongen GA, Yellon D, Smits P.* Human in vivo research on the vascular effects of adenosine. *Eur J Pharmacol.* 2008;585:220-227.
33. *Festugato M.* Adenosine: an endogenous mediator in the pathogenesis of psoriasis. *An Bras Dermatol.* 2015;90:862-7.
34. *Cronstein BN, Sitkovsky M.* Adenosine and adenosine receptors in the pathogenesis and treatment of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2017;13:41-51.