

Marek Cieślak¹, Michał Komoszyński²

Received: 08.02.2006

Accepted: 14.03.2006

Published: 30.06.2006

Czy pochodne nukleozydów i nukleotydów mogą w przyszłości stać się skutecznymi lekami przeciwpadaczkowymi?

Can nucleoside and nucleotide precursors become future successful anti-epileptic drugs?

¹ Oddział Neurologiczny, Wojewódzki Szpital Zespolony w Toruniu² Zakład Biochemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Adres do korespondencji: Marek Cieślak, Oddział Neurologiczny, Wojewódzki Szpital Zespolony w Toruniu, ul. św. Józefa 53/59, 87-100 Toruń, tel.: 056 610 12 42, e-mail: marcies@autograf.pl

Source of financing: Department own sources

Streszczenie

Napady drgawkowe są wynikiem uwalniania neurotransmiterów pobudzających do przestrzeni pozakomórkowej. W ośrodkowym układzie nerwowym ektoadenozyna hamuje egzocytozę glutaminianu i asparaginanu, natomiast ektoгуanozyna, zwiększając wychwyt zwrotny glutaminianu przez astrocyty, obniża jego stężenie poza komórką. W ten sposób oba nukleozydy uczestniczą w hamowaniu napadu drgawkowego. Nukleozydy te, obniżając stężenie powyższych neurotransmiterów poza komórką, chronią neurony przed śmiercią, pełnią więc funkcję neuroprotekcijną. W różnych modelach zwierzęcych padaczek eksperymentalnych wykazano, że w przerwaniu napadu drgawkowego uczestniczą receptory adenozyne A₁ i A_{2A}. Ma miejsce współdziałanie leków przeciwpadaczkowych i receptorów adenozyne, bowiem niektóre z nich, takie jak karbamazepina, działają za pośrednictwem receptorów adenozyne A₁, a niektórzy agoniści receptorów A₁ potęgują działanie przeciwdrgawkowe tych leków. Przeciwdrgawkowe działanie adenozyne i guanozyne oraz agonistów i antagonistów receptorów nukleozydowych wskazuje na możliwość wykorzystania wiedzy o tych procesach w projektowaniu nowych leków przeciwpadaczkowych. Skutecznymi lekami przeciwdrgawkowymi mogą okazać się związki zwiększające stężenie ektoadenozyny, takie jak: inhibitory deaminazy adenozyne, kinazy adenozyne oraz związki hamujące wychwyt zwrotny nukleozydów. Innym sposobem zwiększenia stężenia pozakomórkowej adenozyne jest wzrost aktywności 5'-nukleotydyazy powiększającej pulę ektoadenozyny przez degradację ekto-AMP. Obiecujące są również rezultaty doustnego podania guanozyne i GMP, a także samej guanozyne podanej dokomorowo i dootrzewnowo, które powodowało przerywanie drgawek wywołanych przez agonistę glutaminianu – kwas chinolinowy.

SŁOWA KLUCZOWE: napad drgawkowy, neuroprotekcja, adenozyne, guanozyne, receptory adenozyne**Summary**

Many examples of experimental epilepsy show that epileptic seizures occur due to release of stimulatory neurotransmitters into intracellular spaces. In CNS adenosine suppresses exocytosis of glutamate and asparaginate but guanosine increases the reverse uptake of glutamate by astrocytes and thus lowers its concentration outside the cell. In this process both nucleosides participate in suppressing the epileptic seizures. By decreasing concentration of ectoadenosine and ectoguanosine outside the cell, that compounds can protect neurons

from cellular degeneration. It was shown in many animal models for experimental epilepsy that adenosine A_1 and A_{2A} receptors were involved in the process of stopping the seizures. Moreover, some of the conventional anti-epileptic drugs reveal enhance their therapeutic abilities by interactions with the adenosine receptors, being either agonists or antagonists. These interactions modulate the activity of receptors and consequently regulate the neuroprotection processes. Some agonists of adenosine receptors increase the epileptic episodes reaction to those compounds. Anti-episode action of adenosine and guanosine as well as agonists and antagonists of nucleoside receptors indicate the possibility of applying the knowledge about these processes towards production of new anti-epileptic medication. Successful anti-epileptic medication may be based on compounds that have the ability to increase the concentration of ectoadenosine i.e. adenosine deaminase inhibitors, adenosine kinase inhibitors or compounds with ability to suppress reverse uptake of nucleosides. Another method to increase the concentration of extracellular adenosine is to increase the activity of 5'-nucleotidase. That in effect will increase the amount of ectoadenosine by degradation of ecto-AMP. There are very promising results revealed that oral administration of guanosine and GMP as well as guanosine by itself given intraperitoneally and intraventricularly what halted epileptic seizures caused by quinolinic acid which is a glutamate agonist.

KEY WORDS: epileptic seizure, neuroprotection, adenosine, guanosine, adenosine receptors

WSTĘP

Glutaminian i asparaginian jako neurotransmitery pobudzające wpływają na powstawanie, rozprzestrzenianie i utrzymywanie się napadu padaczkowego⁽¹⁾. U szczurów wywołanie napadów drgawkowych rozniecanych z jąder migdałowatych (*kindling*) zależy od aktywacji receptorów NMDA, co odgrywa również zasadniczą rolę w epileptogenezie⁽¹⁾. W mózgu glutaminian działa za pośrednictwem trzech typów postsynaptycznych receptorów jonotropowych: NMDA (*N-methyl-D-aspartate*), AMPA (*α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate*) i receptorów kainowych oraz trzech klas receptorów metabotropowych zlokalizowanych pre- i postsynaptycznie⁽¹⁾.

Stosując ogniskowe iniekcje antagonistów glutaminianu (*2-amino-7-phosphonoheptanoic acid*, 2-APH), udowodniono w wielu modelach padaczki eksperymentalnej ich przeciwdrgawkową aktywność⁽¹⁾. Antagoniści stosowani w tych badaniach działali selektywnie zarówno na receptory NMDA, jak i na inne receptory glutaminergiczne⁽¹⁾. Stwierdzono, że w przestrzeniach pozakomórkowych mózgu przed napadem drgawkowym i na jego początku wzrasta stężenie glutaminianu i asparaginianu. Dowodzi to, że przed napadem drgawkowym rośnie uwalnianie tych aminokwasów do przestrzeni pozakomórkowej i jednocześnie hamowany jest ich wychwyt zwrotny⁽¹⁾. Badania neurochemiczne wykazały wzrost stężenia glutaminianu i asparaginianu, a także ilości receptorów NMDA w ogniskach padaczkorodnych kory mózgu człowieka⁽²⁾. Adenozyna (Ado) jest jednym z najważniejszych endogennych czynników przeciwdrgawkowych⁽³⁻⁶⁾.

ADENOZYNA I RECEPTORY ADENOZYNOWE W OUN

W ośrodkowym układzie nerwowym obecne są wszystkie podtypy receptorów adenozytowych: A_1 , A_{2A} , A_{2B}

i A_3 ⁽⁴⁻⁶⁾. Każdy z nich jest glikoproteiną związaną z białkiem G. W strukturze receptorów występuje siedem domen transbłonowych zbudowanych z 20-27 aminokwasów. Koniec aminowy białka znajduje się po stronie zewnątrzkomórkowej, a koniec karboksylowy w cytoplazmie⁽⁴⁻⁶⁾. Domeny transbłonowe połączone są przez trzy pętle zewnątrzkomórkowe i trzy wewnątrzkomórkowe. Pętle zewnątrzkomórkowe zawierają reszty cysteiny oraz miejsca N-glikozylacji⁽⁶⁾.

Receptory A_1 i A_{2A} charakteryzują się dużym, a receptory A_{2B} i A_3 znacznie mniejszym powinowactwem do adenozyny. Aktywacja receptora A_1 następuje przy stężeniu adenozyny wynoszącym 0,3-3 nM, A_{2A} 1-20 nM, podczas gdy do aktywacji receptorów A_{2B} i A_3 potrzeba stężenia agona wynoszącego $> 1 \mu\text{M}$ ⁽⁶⁾. Tak więc w warunkach fizjologicznych stężenie pozakomórkowej Ado wahające się w granicach 0,3-1000 nM jest wystarczające do stymulacji receptorów A_1 i A_{2A} , a receptory o mniejszym powinowactwie do agona wymagają do aktywacji wyższego stężenia tego nukleozydu poza komórką. Stężenie ekto-Ado przekraczające $1 \mu\text{M}$, czyli górną granicę fizjologicznego stężenia tego nukleozydu poza komórką, może być spowodowane niedotlenieniem lub niedokrwieniem tkanek⁽⁶⁾.

Receptory A_1 związane są z podrodziną białek G: $G_{(1-3)}$ i G_o . Za ich pośrednictwem hamowana jest aktywność cykazy adenylationowej⁽⁴⁻⁶⁾. Receptory mogą powodować otwarcie kilku typów kanałów potasowych oraz zamykanie części kanałów wapniowych.

Receptory A_{2A} i A_{2B} związane są z białkami G_s i za ich pośrednictwem aktywują cyklazę adenylationową, powodując wzrost w komórce cyklicznego adenylationomonofosforanu (cAMP)⁽⁶⁾. Nie wiadomo, czy pobudzenie receptora A_{2A} daje odmienne rezultaty od pobudzenia receptora A_{2B} . Jednakże oba podtypy różnią się właściwościami farmakologicznymi i występowaniem. W OUN receptor A_{2B} jest szeroko rozpowszechniony, natomiast receptory A_{2A} stwierdzono tylko w regionach dopaminergicznych mózgu.

Receptory A_3 nie są tak dobrze poznane jak pozostałe. Wiadomo, że stymulacja tego receptora prowadzi do tworzenia trifosforanu inozytolu (IPA3), a w konsekwencji do wzrostu stężenia wapnia w komórce. Receptory te są rozpowszechniane w całym mózgu, ale ich gęstość jest znamiennej mniejsza niż pozostałych^(5,6).

Receptory adenozynowe są szeroko rozpowszechnione w układzie nerwowym^(4,6). Są związane z błonami komórkowymi neuronów, komórek gwałgowych i komórek śródbłonna mózgowych naczyń krwionośnych. Najczęściej spotykany jest receptor A_1 . Jest on obecny w błonach synaptycznych neuronów takich struktur mózgowych, jak: kora mózgowa, hipokamp, mózdzek, rdzeń kręgowy oraz wzgórze i prążkowie^(4,6). Podtyp A_{2A} jest związany z rejonami mózgu bogatymi w unerwienie dopaminergiczne. Niewielkie ilości mRNA tego receptora wykryto w takich rejonach mózgu szczura, jak: kora mózgu, hipokamp, mózdzek oraz wzgórze i podwzgórze^(5,6). Natomiast nieznaczne ilości mRNA receptora A_{2B} wykryto w takich rejonach mózgu, jak: kora mózgowa, hipokamp, mózdzek, wzgórze, podwzgórze i prążkowie⁽⁶⁾. Z kolei obecność mRNA receptora A_3 stwierdzono w hipokampie, podwzgórze i wzgórzu szczura⁽⁶⁾.

W warunkach fizjologicznych stężenie pozakomórkowej adenozyny (ekto-Ado) wynosi 0,3-300 nM, a w niedotlenieniu mózgu stężenie Ado może wzrosnąć nawet stukrotnie^(5,6). Ektoadenozyna w warunkach fizjologicznych oraz po stymulacji receptorów, np. NMDA, pochodzi głównie z pozakomórkowej degradacji nukleotydów⁽⁶⁾. Niektórzy autorzy uważają, że w warunkach patologicznych, np. w niedotlenieniu, adenozyna powstaje w komórce w wyniku degradacji ATP, a następnie jest uwalniana do synapsy⁽⁶⁾. Pogląd ten budzi kontrowersje z uwagi na fakt, iż z dotychczasowej wiedzy wiadomo, że głównym sposobem transportu tego nukleozydu przez błonę komórkową jest transport ułatwiony^(5,6). Badania eksperymentalne wskazują, że drgawki znacznie podwyższają stężenie adenozyny w mózgu i płynie mózgowo-rdzeniowym, co stwierdza się już w 30-60 sek. po napadzie drgawkowym⁽⁷⁾. Badania Winn i wsp. wykazały, że w ciągu 30 sekund od początku napadu drgawkowego wywołanego bikukuliną u szczurów wzrasta mózgowy przepływ krwi (*cerebral blood flow*, CBF)⁽⁷⁾. Zmiany te korelowały z podwyższonym stężeniem adenozyny w tkance nerwowej. Stężenie adenozyny wzrastało w ciągu 10 sekund od początku drgawek i utrzymywało się przez 120 sekund przy prawidłowej ($PaO_2 = 100$ mmHg) lub podwyższonej ($PaO_2 = 200$ mmHg) prężności tlenu⁽⁷⁾. Sugeruje to, że adenozyna uczestniczy w regulacji mózgowego przepływu krwi w czasie napadu drgawkowego⁽⁷⁾. Mechanizmem ochraniającym neurony podczas napadu padaczkowego jest hamowanie przez adenozynę wydzielania nie tylko glutaminianu i asparaginianu, ale także acetylocholin, noradrenalin, dopaminy i kwasu gamma-aminomasłowego (GABA). Proces ten odbywa się za pośrednictwem receptorów A_1 i zapobiega ekscyto-

toksyczności^(4,6,8,9). Adenozyna, aktywując receptory presynaptyczne A_1 , hamuje napływ jonów Ca^{2+} do komórki przez zależne od napięcia kanały wapniowe. W następstwie tego dochodzi do inhibicji uwalniania glutaminianu. Aktywacja postsynaptycznych receptorów A_1 powoduje zmniejszenie pobudliwości błony postsynaptycznej oraz jej hiperpolaryzację, co zwiększa przewodność błony komórkowej dla jonów K^+ i zmniejsza dla jonów Ca^{2+} . W konsekwencji powoduje to hamowanie pobudliwości receptorów NMDA. W wyniku aktywacji tych receptorów zmniejsza się również zależna od NMDA synteza tlenu azotu. Również powyższe fakty potwierdzają neuroprotekcijną funkcję adenozyny.

WYSTĘPOWANIE POCHODNYCH GUANINY W OUN

W OUN obecność pochodnych guaniny stwierdzono w pęcherzykach synaptycznych neuronów, które zawierają GTP oraz hydrolazy nukleotydów katalizujących konwersję GTP do GDP, GMP i guanozyny. Wykazano również istnienie zarówno stałego, jak i indukowanego mechanizmu uwalniania GTP do przestrzeni międzykomórkowej. Na powierzchni komórek stwierdzono miejsca wiązania guanozyny i nukleotydów guaninowych (receptory?). Najnowsze badania wykazały, że egzogenne podanie umiarkowanych ilości guanozyny i nukleotydów guaninowych wywiera wpływ neuroprotekcyny⁽¹⁰⁾.

POTENCJALNA ROLA PRZECIWDRGAWKOWA AGONISTÓW RECEPTORÓW ADENOZYNOWYCH

W tym rozdziale przedstawimy wyniki eksperymentów wskazujących, że agoniści receptorów A_1 są skutecznymi związkami przeciwdrgawkowymi w wielu modelach padaczki eksperymentalnej u zwierząt. Powyższe związki skutecznie hamowały drgawki wywołane przez leptaazol, bikukulinę, pikrotoksynę, NMDA, kwas kainowy, pilokarpinę i przez aktywator kanałów wapniowych Bay k-8644⁽¹¹⁾. Analogi receptorów A_1 są również skuteczne w wygaszaniu drgawek w modelu drgawek rozniecanych, padaczki eksperymentalnej (*kindling*) i w drgawkach wywołanych hipoksją i prądem elektrycznym⁽¹¹⁾.

Obecnie stosowane leki przeciwpadaczkowe można podzielić na leki konwencjonalne (podstawowe) oraz leki nowej generacji. Do najczęściej stosowanych leków podstawowych zaliczamy karbamazepinę i kwas walproinowy. Karbamazepina blokuje kanały sodowe zależne od potencjału i wtórnie zmniejsza uwalnianie glutaminianu i przemianę katecholamin. Kwas walproinowy wybiórczo zwiększa stężenie GABA w synapsach oraz zmniejsza zużycie GABA przez komórki gwałgowe i zakończenia nerwowe poprzez hamowanie aminotransferazy GABA i dehydrogenazy semialdehdowej. Karbamazepina działa jako agonista receptorów A_1 ⁽¹²⁾.

Leki nowej generacji można podzielić na trzy klasy:

1. leki przedłużające inaktywację kanałów sodowych, co zapobiega depolaryzacji komórki (okskarbazepina, lamotrygina, topiramata i gabapentyna);
2. leki zwiększające stężenie GABA – wigabatryna (nieodwracalny inhibitor GABA transaminazy), tiagabina (hamuje wychwyt zwrotny GABA), gabapentyna (zwiększa uwalnianie GABA) oraz topiramata (potęguje działanie GABA na receptor GABA_A);
3. leki działające przez receptory glutaminowe – felbamata blokuje czynność receptora NMDA, topiramata blokuje receptor AMPA.

Podanie leków przeciwpadaczkowych i agonistów receptorów adenozytowych wzmacnia efekt terapeutyczny⁽¹²⁾. Wyniki te wskazują na synergistyczne oddziaływanie na czynność przeciwdrgawkową agonistów receptorów adenozytowych i leków przeciwpadaczkowych. Podobnie niektóre leki przeciwpadaczkowe modulują transmisję purynergiczną⁽¹³⁾. Wśród leków przeciwpadaczkowych tylko kwas walproinowy pozostaje bez wpływu na sygnalizację z udziałem puryn⁽¹²⁾.

Do uzyskania efektu przeciwdrgawkowego niezbędny jest wzrost stężenia większy niż fizjologicznie adenozyne poza komórką. Wzrost ilości tego nukleozydu poza komórką jest jednym z mechanizmów działania przeciwdrgawkowego takich związków, jak pochodne benzodwuzepiny oraz difenylhydantoiny, które hamują wychwyt zwrotny adenozyne⁽¹²⁾.

Poniżej przedstawiamy szereg przykładów działania agonistów receptorów adenozytowych hamujących drgawki w wielu modelach padaczki eksperymentalnej.

Stwierdzono, że niektórzy agoniści receptorów adenozytowych, jak 2-chloroadenozyne i *L*-PIA (*L*-fenylopropyl-adenozyne) – agonista receptorów A₁, oraz NECA (5'-*N*-etylkarboksamidoadenozyne) – agonista receptorów A₂, potęgują działanie niektórych leków przeciwpadaczkowych przy ich niezmiennym stężeniu we krwi^(12,13).

Również APNEA [*N*⁶-2-(4-aminofenyl)etyl-adenozyne], selektywny agonista receptorów A₃, uczestniczących w aktywacji apoptozy komórek, podany łącznie z karbamazepiną okazał się skutecznym środkiem przeciwdrgawkowym w padaczce eksperymentalnej⁽¹²⁾.

W modelu padaczki lekoopornej u myszy podanie karbamazepiny nie wpływa na wygaszenie drgawek, jednak dootrzewnowe podanie selektywnego agonisty receptorów A₁ – 2-chloro-*N*⁶-cyclopentyladenosine (CCPA; 1,5 lub 3 mg/kg) wygasilo w ciągu 3,5 godziny zmiany napadowe w zapisie EEG⁽¹⁴⁾.

Jedną z przyczyn powstawania drgawek jest zachwianie metabolizmu komórek nerwowych prowadzące do obniżenia ich ładunku energetycznego, wynikające z zahamowania produkcji ATP. Dzieje się tak przy zatruciu toksynami, jak kwas 3-nitropropionowy i sarin, hamującymi aktywność dehydrogenazy bursztynianowej^(15,16).

W obu przypadkach podanie specyficznego agonisty receptorów A₁ **R-PIA** [**R(-)N⁶-(2-phenyl-isopropyl)adeno-**

sine], jak i niespecyficznego agonisty receptorów adenozytowych A₁/A₂ **2-CADO** (2-chloroadenozyne) przed iniekcją środka wywołującego drgawki zapobiegało rozwojowi drgawek, a ponadto obniżało śmiertelność powodowaną przez drgawki⁽¹⁵⁾.

Drgawki powstają również w wyniku niedotlenienia, którego skutkiem jest zahamowanie syntezy ATP. Ma to szczególne znaczenie w okresie okołoporodowym, a ich wystąpienie jest czynnikiem ryzyka padaczki w wieku dorosłym⁽¹¹⁾. Napady drgawkowe obserwuje się także u dorosłych, np. w przebiegu udaru niedokrwinnego mózgu czy zatrzymaniu oddechu i krążenia⁽¹¹⁾. Dlatego na uwagę zasługują badania Zgodzińskiego i wsp. nad wpływem agonistów i antagonistów receptorów adenozytowych na drgawki wywołwane u myszy przez niedotlenienie, które spowodowało drgawki u 90% badanych zwierząt⁽¹¹⁾. Zwierzęta te w późniejszym okresie życia wykazywały wzrost skłonności do drgawek. Podanie **R-PIA** – agonisty receptora A₁, przed niedotlenieniem wydłużyło znacznie, zależnie od dawki, okres utajenia drgawek. Efekt ten znosił antagonistę receptorów A₁ – **CPT (8-cyclopentylthiofiline)**. Wyniki te pokazują, że agoniści receptorów A₁ skutecznie hamują powstawanie i zmniejszają skłonność badanych zwierząt do drgawek.

Rezultaty uzyskane w tej samej pracowni wskazują, że również agonista receptorów A₂ **DPMA** [**N(6)-[2,5-dimethoxyphenyl]-2-(2-methyl-phenyl)ethyladenosine**] stosowany w wysokiej dawce 5 mg/kg i tylko w niektórych modelach padaczki wykazywał działanie przeciwdrgawkowe. Takie działanie agonistów receptorów A_{2A} jest niezrozumiałe, gdyż wiadomo, że pobudzenie receptorów A_{2A} przez niespecyficznych agonistów tych receptorów powoduje wzrost pozakomórkowego stężenia glutamianu i acetylcholin. Być może agonista receptora A_{2A} w wysokich dawkach powoduje, z uwagi na niewielką różnicę w powinowactwie tego związku do obu receptorów, aktywację również receptora A₁⁽¹¹⁾. Wyjaśnienie mechanizmu działania wyżej omawianych związków wymaga dalszych badań.

POTENCJALNA ROLA PRZECIWDRGAWKOWA ENZYMÓW DEGRADUJĄCYCH NUKLEOTYDY I NUKLEOZYDY

Zlokalizowane w błonie komórkowej transportery białkowe adenozyne, przenosząc ten nukleozyd do komórki, obniżają jego stężenie w przestrzeni pozakomórkowej. Ektoadenozyne z udziałem deaminazy adenozyne (ADA) jest metabolizowana do ektoinozyny^(4,6,17). Stężenie adenozyne w komórkach OUN jest regulowane głównie przez aktywność kinazy adenozyne (AKA), która obniża stężenie adenozyne, używając jej jako substratu w syntezie AMP (adenozynomonofosforan)^(4,6,17). Badania immunohistochemiczne mózgu wykazały, że aktywność kinazy jest rozmieszczona równomiernie we

wszystkich strukturach mózgu, głównie w neuronach i astrocytach opuszki węchowej, prądkowia i pnia mózgu⁽¹⁸⁾. Wzrost ekspresji kinazy adenozyliny w hipokampie myszy po napadach drgawkowych wywołanych wstrzyknięciem kwasu kainowego może sugerować jej udział w powstawaniu napadu drgawkowego⁽¹⁹⁾. Jednak w warunkach patologicznych w komórce obserwuje się obniżoną aktywności kinazy adenozyliny. W tym przypadku główną drogą przemian adenozyliny jest deaminacja adenozyliny do inozyny z udziałem deaminazy adenozyliny⁽⁴⁾. Istniejące mechanizmy transportu biernego regulują poziom adenozyliny, tak że wyrównują stężenia tego związku po obu stronach błony komórkowej⁽⁶⁾. W takim razie każde obniżenie stężenia tego nukleozydu w komórce spowoduje zmniejszenie stężenia adenozyliny poza komórką. Efektem będzie obniżenie progu drgawkowego. Dowodzi to, że istotną funkcję w hamowaniu czynności drgawkowej mogą pełnić inhibitory transportu adenozyliny (np. dipirydamol czy propentofilina). Zahamowanie transportu adenozyliny do komórki spowoduje akumulację adenozyliny podanej parenteralnie, co wraz z wysoką aktywnością ekto-5'-nukleotydyazy hydrolizującej ekto-AMP do ektoadenozyliny spowoduje gwałtowny wzrost stężenia adenozyliny poza komórką⁽⁶⁾. Rosnące stężenie adenozyliny, aktywując receptory A₁, podwyższy próg drgawkowy. Dipirydamol jest już stosowany jako lek, który hamuje wychwyty zwrotny adenozyliny. Lek ten łącznie z kwasem acetylosalicylowym (Aggrenox) jest skutecznie stosowany w profilaktyce udaru niedokrwiennego mózgu⁽²⁰⁾. Inny bloker wychwyty zwrotnego – propentofilina, antagonist receptorów A₁ i A_{2A} przez inhibicję aktywności fosfodiesteraz wykazuje działanie neuroprotektoryjne w różnych modelach niedotlenienia mózgu⁽⁴⁾. Być może inne związki o podobnym mechanizmie działania mogłyby być skutecznymi lekami przeciwdrgawkowymi. Adenozylina poza komórką może ulegać deaminacji do inozyny z udziałem deaminazy ektoadenozyliny. Zatem enzym ten obniża stężenie Ado i tą drogą uwalnia receptory adenozylinowe (P1) od ich naturalnego agonisty. W wielu regionach mózgu aktywność deaminazy adenozyliny poza komórką jest bardzo niska, a niektóre są jej pozbawione⁽⁶⁾. Również w naczyniach krwionośnych aktywność ADA jest niewielka w porównaniu z aktywnością hydrolaz ektonukleotydydów purynowych⁽⁶⁾. Tak więc w przestrzeniach międzykomórkowych i we krwi powinno utrzymywać się stałe wysokie stężenie tego nukleozydu. Mechanizm ten, naszym zdaniem, stanowi fizjologiczne zabezpieczenie komórek nerwowych przed uszkodzeniem. W tej sytuacji inhibitory deaminazy adenozyliny mogą również zostać wykorzystane jako środki przeciwdrgawkowe. W przypadku neurotoksyczności wywołanej przez metamfetaminę (MTH) stwierdzono, że rosnące w następstwie inhibicji ADA i AKA oraz hamowania transportu stężenie adenozyliny działa neuroprotektoryjnie⁽¹⁹⁾. W etiologii padaczki szczególna rola przypada E-NTPD-azie 1 (CD39, apiraza), która degraduje ATP do AMP.

Jednym z istotnych powodów świadczących o udziale tego enzymu w etiologii choroby jest pozycja chromosomowa ludzkiego CD39 (10q23.1 do q24.1) pokrywająca się z pozycją grupy genów odpowiedzialnych za występowanie padaczki ogniskowej z objawami słuchowymi⁽¹⁷⁾. Ponadto aktywność E-NTPD-azy 1 w hipokampie i korze skroniowej u ludzi z padaczką jest obniżona⁽¹⁷⁾. Obserwacje te sugerują, że mutacja w genie apirazy stanowi jedną z przyczyn padaczki. W takich przypadkach spadek aktywności apirazy powodowałby wzrost pozakomórkowego ATP i jednocześnie obniżenie stężenia pozakomórkowej adenozyliny⁽¹⁷⁾.

Istnieje szereg dowodów przemawiających za udziałem ektohydrolaz nukleotydydów w powstawaniu napadów drgawkowych. Badania prowadzone nad aktywnością dwu ektohydrolaz nukleotydydów (E-NTPD-azy 1 oraz 5'-nukleotydyazy hydrolizującej AMP do adenozyliny) w synaptosomach kory mózgowej i hipokampa szczurów wykazały znamienne wzrost aktywności 5'-nukleotydyazy w synaptosomach kory mózgowej i hipokampa po wywołaniu stanu padaczkowego przez pilokarpinę⁽²¹⁾. Zmiany te utrzymywały się przez okres 50 dni od podania pilokarpiny i ponad sto dni od podania kainianu⁽²¹⁾. Powyższe badania sugerują, że stan padaczkowy może zwiększać aktywność zarówno E-NTPD-azy 1, jak i 5'-ektonukleotydyazy. Wykazano również wzrost aktywności 5'-nukleotydyazy we krwi szczurów po pojedynczym napadzie drgawkowym wywołanym przez PTZ (pentylenetetrazol)⁽²²⁾. Skutkiem jest znaczny wzrost ilości ektoadenozyliny działającej przeciwdrgawkowo i neuroprotektoryjnie⁽²²⁾.

WPŁYW GUANOZYNY I NUKLEOTYDÓW GUANINOWYCH NA DRGAWKI I ŚMIERTELNOŚĆ WYWOŁANE PRZEZ CZYNNIKI GLUTAMINERGICZNE I KWAS CHINOLINOWY

Agoniści adenozyliny i antagoniści glutaminianu są czynnikami przeciwdrgawkowymi, podczas gdy antagoniści adenozyliny i agoniści glutaminianu sprzyjają powstawaniu drgawek⁽¹⁰⁾. Neuroprotektoryjne działanie egzogennej guanozyliny i nukleotydydów guanozynowych wykazano *in vitro* i *in vivo*^(10,23). Stwierdzono, że nukleotydy guaninowe (GTP, GDP i GMP) działają neuroprotektoryjnie w ekscytotoksyczności wywołanej kainianem i NMDA⁽²⁴⁾. Guanozylina i adenozylina oraz układ glutaminergiczny oddziałują wzajemnie na siebie. Pozakomórkowe nukleotydy guaninowe, a w mniejszym stopniu guanozylina, wywierają wpływ na transmisję glutaminergiczną. Związki te, hamując wiązanie ligandów receptorów glutaminergicznych, modulują odpowiedź komórkową na glutaminian i jego analogi oraz ekscytotoksyczność⁽²³⁾. Glutaminian stymuluje wydzielanie adenozyliny, która, działając poprzez presynaptyczne receptory A₁, hamuje uwalnianie glutaminianu^(10,23). Natomiast guanozylina

w stężeniu 1 μM uwalniana z udziałem kainianu zwiększa wychwyty zwrotny glutaminianu przez astrocyty^(10,23). Guanozyna podobnie jak adenozyzna chroni mózg narażony na niedotlenienie i hipoglikemię oraz zapobiega degradacji neuronów powodowanej przez niekontrolowaną stymulację receptorów NMDA (ekscytotoksyczność)^(10,23). W badaniach Schmidta i wsp. udowodniono, że dootrzewnowe podanie GMP i guanozyny myszom zapobiega drgawkom wywołanym przez kwas chinoliny (agonistę receptorów NMDA) wywołujący drgawki u wszystkich badanych zwierząt⁽²³⁾. Przeciwnie dootrzewnowe podanie antagonisty NMDA – MK-801, zapobiegało występowaniu drgawek u 100% badanych zwierząt⁽²³⁾. Podanie guanozyny i GMP na 10, 30 i 60 minut przed kwasem chinolinowym zapobiegło powstaniu drgawek aż u 70-80% badanych myszy⁽²³⁾. W celu wyeliminowania ewentualnego udziału receptorów adenozyznowych w tym procesie, badania prowadzono w obecności kofeiny (nieselektywnego antagonisty receptorów adenozyznowych) podanej dootrzewnowo przed kwasem chinolinowym⁽²³⁾. Kofeina nie hamowała prewencyjnego działania guanozyny na drgawki wywołane przez kwas chinolinowy, co dowodzi, że receptory adenozyznowe A_1 i A_{2A} nie są zaangażowane w ten proces. Protekcyjne działanie guanozyny wykazano również w drgawkach wywołanych przez α -dendrotoksynę (α -DTX). Przeciwnie w GABA-ergicznym modelu guanozyna, GMP oraz MK-801 (antagonista NMDA) nie zapobiegały powstawaniu drgawek wywołanych przez pikrotoksynę⁽²³⁾. Powstawaniu drgawek zapobiegał tylko fenobarbital, agonista receptorów GABA_A. W drgawkach wywołanych kainianem guanozyna również nie wpływała na zmianę progu drgawkowego i nie obniżała w sposób istotny statystycznie śmiertelności zwierząt⁽²³⁾. Badania behawioralne nad zwierzętami wykazały, iż efekt unikania osiągnięto przez dootrzewnowe podanie guanozyny w dawce 1-7,5 mg/kg, podczas gdy adenozyzna powodowała podobny efekt w stężeniu 100-1000 mg/kg⁽¹⁰⁾. Na udział pochodnych guaniny w modulacji procesów transmisji sygnałów w OUN wskazuje również obecność w błonach komórkowych mózgu szczurów miejsc o wysokim powinowactwie do guanozyny i niezależna od receptorów adenozyznowych stymulacja przez guanozynę wychwyty zwrotnego glutaminianu⁽¹⁰⁾. Dokomorowa aplikacja analogów GTP, GDP i GMP także zapobiegła powstawaniu drgawek wywołanych przez kwas chinolinowy⁽²³⁾. Sądymy iż podane dokomorowo nukleotydy guaninowe są hydrolizowane do guanozyny przez egzo-NTPD-azy znajdujące się w płynie mózgowo-rdzeniowym⁽²³⁾. Nukleotydy nie przenikają przez błony neuronów, jedynie nukleozydy są transportowane przez barierę krew – mózg, jak również błony komórkowe z udziałem przenośników białkowych. Tak więc nukleotydy muszą zostać zhydrolizowane do nukleozydów, by przeniknąć barierę płyn mózgowo-rdzeniowy – mózg, aby znaleźć się w ognisku padaczkorodnym i tą drogą

hamować drgawki. Uważamy więc, że nie nukleotydy guaninowe, a produkt ich hydrolizy – guanozyna, jest skutecznym środkiem przeciwdrgawkowym. Nie można również wykluczyć obecności na komórkach wyścielających układ komorowy miejsc wiązania nukleotydy i nukleozydów guaninowych.

Ogromną zaletą guanozyny jest przeciwdrgawkowa skuteczność doustnie podanego nukleozydu. Wykazano bowiem, że guanozyna podana tą drogą myszom zapobiegała drgawkom wywołanym przez kwas chinolinowy, drgawkom i śmiertelności wywołanym przez α -dendrotoksynę (czynnik uwalniający glutaminian), jak również potencjalnej toksyczności kainianu wywołanej przez MK-801 (bloker kanałów NMDA)⁽¹⁰⁾. Jednakże podawana w ten sposób guanozyna nie wpływała na drgawki wywołane przez kainian lub pikrotoksynę – antagonistę GABA_A⁽¹⁰⁾. Skuteczność doustnie podanej guanozyny wynika z istnienia w komórkach jelit, w naczyniach włosowatych mózgu oraz barierze krew – mózg mechanizmów pozwalających na transport nukleozydów⁽¹⁰⁾.

PODSUMOWANIE

Celem tego artykułu było zwrócenie uwagi na grupę związków pochodnych adeniny i guaniny, ich receptorów oraz agonistów i antagonistów, które uczestniczą w transmisji i modulacji sygnału purynowego, a przy tym mają wyraźne działanie przeciwdrgawkowe. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż oba omawiane nukleozydy charakteryzuje działanie na dwóch płaszczyznach, bowiem oba te związki poza zdolnością przerywania napadu drgawkowego posiadają silne działanie neuroprotekcyjne. Ochrona neuronów jest ważna podczas napadu padaczkowego, zwłaszcza podczas bezdechu występującego w pierwszej fazie napadu toniczno-klonicznego. Prezentowane wyżej badania pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

1. Aktywacja receptorów adenozyznowych A_1 i/lub blokada receptorów A_{2A} jest skutecznym sposobem przerywania napadu drgawkowego.
2. Adenozyzna, jak również antagoniści receptorów A_{2A} zmniejszają uwalnianie neurotransmiterów w OUN, więc najlepszy efekt przeciwdrgawkowy i neuroprotekcyjny będzie można uzyskać, stosując jednocześnie agonistę receptorów A_1 i antagonistę receptorów A_{2A} .
3. Istniejący synergizm działania agonistów receptorów adenozyznowych i leków przeciwpadaczkowych na czynność drgawkową oraz wpływ konwencjonalnych leków przeciwpadaczkowych na transmisję purynergiczną wskazuje, że ich łączne stosowanie pozwoli na skuteczniejsze hamowanie czynności drgawkowej, a także na obniżenie dawki leku przeciwpadaczkowego.
4. Należy jednak pamiętać, że poważnym ograniczeniem zastosowania klinicznego agonistów recepto-

rów adenozytowych jest ich działanie obwodowe powodujące obniżenie ciśnienia krwi, temperatury i bradykardię. Być może związki podobne do nowych selektywnych agonistów A₁, pozbawionych działania obwodowego, takie jak NNC 21-0041 i NNC 21-0136 o silnym działaniu neuroprotektynym, wykażą również skuteczne właściwości przeciwdrgawkowe.

5. Związki podnoszące stężenie endogennej adenozyliny, a więc związki hamujące degradację adenozyliny (inhibitory deaminazy i kinazy adenozyliny) oraz hamujące wychwyty zwrotne nukleozydów mogą również okazać się skutecznymi lekami przeciwdrgawkowymi.
6. Skutecznymi lekami przeciwdrgawkowymi mogą być także związki aktywujące ektoenzymy (E-NTPD-azę 1 i 5'-nukleotydatazę) hydrolizujące nukleotydy adeninowe i w ten sposób zwiększające stężenie ektoadenozyliny.
7. Silne działanie przeciwdrgawkowe posiada guanozyna oraz analogi GTP, GDP i GMP.
8. W przypadku pochodnych guaniny na uwagę zasługują pozytywne wyniki doustnego podawania guanozyny i GMP w napadach indukowanych kwasem chinolinowym – agonistą glutaminianu.

PIŚMIENNICTWO:

1. Meldrum B.S.: The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. *Neurology* 1994; 11 (supl. 8): 14-23.
2. Heyes M.P., Wyler A.R., Devinsky O. i wsp.: Quinolinic acid concentrations in brain and cerebrospinal fluid of patients with intractable complex partial seizures. *Epilepsia* 1990; 31: 172-177.
3. During M.J., Spenser D.D.: Adenosine: a potential mediator of seizure arrest and postictal refractoriness. *Ann. Neurol.* 1992; 32: 618-624.
4. Wardas J.: Neuroprotective role of adenosine in the CNS. *Pol. J. Pharmacol.* 2002; 54: 313-326.
5. Zalewska-Kaszubska J.: Rola adenozyliny w procesach neurodegeneracyjnych. *Neurol. Neurochir. Pol.* 2002; 36: 329-336.
6. Romanowska M., Komoszyński M.: Adenozylina – neuroprzebieg i neuromodulator w centralnym układzie nerwowym. *Postępy Biochemii* 2002; 48: 230-238.
7. Winn R.H., Welsh J.E., Rubio R. i wsp.: Changes in brain adenosine during bicuculline induce seizures in rats. *Circ. Res.* 1980; 47: 568-577.
8. Kaiser S.M., Quinn R.J.: Adenosine receptors as potential therapeutic targets. *Drug Discovery Today* 1999; 12: 542-551.
9. Tancredi V., D'Antuono M., Nehling A. i wsp.: Modulation of epileptiform activity by adenosine A₁ receptor – mediated mechanisms in the juvenile rat hippocampus. *J. Pharm. Exp. Ther.* 1998; 286: 1412-1419.
10. Lara D.R., Schmidt A.P., Frizzo M.E. i wsp.: Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents. *Brain Res.* 2001; 912: 76-180.
11. Zgodziński W., Rubaj A., Kleinrok Z. i wsp.: Effect of adenosine A₁ and A₂ receptor stimulation on hypoxia-induced convulsions in adult mice. *Pol. J. Pharmacol.* 2001; 53: 83-92.
12. Borowicz K.K., Kleinrok Z., Czuczwar S.J.: N⁶-2-(4-aminophenyl) ethyl-adenosine enhances the anticonvulsive action of conventional antiepileptic drugs in the kindling model of epilepsy in rats. *Eur. Neuropsychopharm.* 2000; 10: 237-243.
13. Borowicz K.K., Łuszczki J., Czuczwar S.J.: 2-Chloro-adenosine, a preferential agonist of adenosine A₁ receptors, enhances the anticonvulsant activity of carbamazepine and clonazepam in mice. *Eur. Neuropsychopharm.* 2002; 12: 173-179.
14. Gouder N., Fritschy J.M., Boison D.: Seizure suppression by adenosine A₁ receptor activation in mouse model of pharmacoresistant epilepsy. *Epilepsia* 2003; 44: 877-885.
15. Zuchora B., Urbańska E.M.: Effect of adenosine receptor agonist on neurodegenerative and convulsive activity of mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid. *Pol. J. Pharmacol.* 2001; 53: 69-71.
16. Harrison P.K., Bueters T.J., Ijzerman A.P. i wsp.: Partial adenosine A₁ receptor agonist inhibit sarin-induced epileptiform activity in the hippocampal slice. *Eur. J. Pharmacol.* 2003; 471: 97-104.
17. Kukulski F., Komoszyński M.: E-NTPD-azy – enzymy uczestniczące w procesach sygnalizacji w centralnym układzie nerwowym. *Postępy Biologii Komórki* 2002; 29: 449-463.
18. Gouder N., Scheurer L., Fritschy J.M. i wsp.: Overexpression of adenosine kinase in epileptic hippocampus contributes to epileptogenesis. *J. Neurosci.* 2004; 24: 692-701.
19. Gołmbiowska K., Zylewska A.: Effect of adenosine kinase, adenosine deaminase and transport inhibitors on striatal dopamine and stereotypy after methamphetamine administration. *Neuropharmacol.* 2000; 39: 2124-2132.
20. Cieślak M., Komoszyński M.: Rola i potencjalne znaczenie terapeutyczne nukleotydu i nukleozydu w udarze niedokrwinnym mózgu. *Aktualn. Neurol.* 2004; 2: 126-131.
21. Bonan C.D., Walz R., Pereira G.S. i wsp.: Changes in synaptosomal ectonucleotidase activities in two models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 2000; 39: 229-238.
22. Bonan C.D., Walz R., Pereira G.S. i wsp.: Altered ATP hydrolysis induced by pentylenetetrazol kindling in rat brain synaptosomes. *Neurochem. Res.* 2000; 25: 775-779.
23. Schmidt A.P., Lara D.R., Maraschin J. i wsp.: Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. *Brain Res.* 2000; 864: 40-43.
24. Morciano M., Ortinau S., Zimmermann H.: Guanine nucleotides inhibit NMDA and kainate-induced neurotoxicity in cultured rat hippocampal and neocortical neurons. *Neurochem. Int.* 2004; 45: 95-101.
25. Portela L., Osés J., Silveira A. i wsp.: Guanine and adenine nucleotidase in rat cerebrospinal fluid. *Brain Res.* 2002; 950: 74-78.