

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

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

<sup>1</sup> Oddział Neurologiczny, Wojewódzki Szpital Zespolony w Toruniu

<sup>2</sup> 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.: 56 610 12 42, e-mail: marcies@autograf.pl

Praca finansowana ze środków własnych

### Streszczenie

Napady drgawkowe są wynikiem uwalniania neurotransmiterów pobudzających do przestrzeni pozakomórkowej. W ośrodkowym układzie nerwowym ektoadenozyna hamuje egzocytózę glutaminianu i asparagianu, 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, pełniąc więc funkcję neuroprotekcijną. W różnych modelach zwierzęcych padaczek eksperymentalnych wykazano, że w przerwaniu napadu drgawkowego uczestniczą receptory adenozynowe A<sub>1</sub> i A<sub>2A</sub>. Ma miejsce współdziałanie leków przeciwpadaczkowych i receptorów adenozynowych, bowiem niektóre z nich, takie jak karbamazepina, działają za pośrednictwem receptorów adenozynowych A<sub>1</sub>, a niektórzy agonści receptorów A<sub>1</sub> potęgują działanie przeciwdrgawkowe tych leków. Przeciwdrgawkowe działanie adenozyiny i guanozyiny 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 adenozyiny, kinazy adenozyinowej oraz związki hamujące wychwyt zwrotny nukleozydów. Innym sposobem zwiększenia stężenia pozakomórkowej adenozyiny jest wzrost aktywności 5'-nukleotydazy powiększającej pulę ektoadenozyny przez degradację ektoAMP. Obiecujące są również rezultaty doustnego podania guanozyiny i GMP, a także samej guanozyiny podanej dokomorowo i dootrzewnowo, które powodowało przerywanie drgawek wywoływanych przez agonistę glutaminianu – kwas chinolinowy.

**Słowa kluczowe:** napad drgawkowy, neuroprotekcja, adenozyina, guanozyina, receptory adenozyinowe

### 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<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> 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 ectoAMP. 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<sup>(1)</sup>. U szczurów wywołanie napadów drgawkowych rozniecanych z jąder migdałowatych (*kindling*) zależy od aktywacji receptorów NMDA, co odgrywa również zasadniczą rolę w epileptogenezie<sup>(1)</sup>. 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<sup>(1)</sup>.

Stosując ogniskowe iniekcje antagonistów glutaminianu (*2-amino-7-phosphonoheptanoic acid*, 2-APH), udowodniono w wielu modelach padaczki eksperymentalnej ich przeciwdrgawkową aktywność<sup>(1)</sup>. Antagoniści stosowani w tych badaniach działali selektywnie zarówno na receptory NMDA, jak i na inne receptory glutaminergiczne<sup>(1)</sup>. 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 wychwyty zwrotny<sup>(1)</sup>. Badania neurochemiczne wykazały wzrost stężenia glutaminianu i asparaginianu, a także ilości receptorów NMDA w ogniskach padaczkorodnych kory mózgu człowieka<sup>(2)</sup>. Adenozyna (Ado) jest jednym z najważniejszych endogennych czynników przeciwdrgawkowych<sup>(3-6)</sup>.

## ADENOZYNA I RECEPTORY ADENOZYNOWE W OUN

W ośrodkowym układzie nerwowym obecne są wszystkie podtypy receptorów adenozytowych: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> i A<sub>3</sub><sup>(4,6)</sup>. 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<sup>(4,6)</sup>. Domeny transbłonowe połączone są przez trzy pętle zewnątrzkomórkowe i trzy wewnątrzkomórkowe. Pętle zewnątrzkomórkowe zawierają reszty cysteiny oraz miejsca N-glikozylacji<sup>(6)</sup>.

Receptory A<sub>1</sub> i A<sub>2A</sub> charakteryzują się dużym, a receptory A<sub>2B</sub> i A<sub>3</sub> znacznie mniejszym powinowactwem do adenozyliny. Aktywacja receptora A<sub>1</sub> następuje przy stężeniu adenozyliny wynoszącym 0,3-3 nM, A<sub>2A</sub> 1-20 nM, podczas gdy do aktywacji receptora A<sub>2B</sub> i A<sub>3</sub> potrzeba stężenia agona wynoszącego

>1 μM<sup>(6)</sup>. Tak więc w warunkach fizjologicznych stężenie pozakomórkowej Ado wahające się w granicach 0,3-1000 nM jest wystarczające do stymulacji receptorów A<sub>1</sub> i A<sub>2A</sub>, a receptory o mniejszym powinowactwie do agona wymagają do aktywacji wyższego stężenia tego nukleozydu poza komórką. Stężenie ektoAdo przekraczające 1 μM, czyli górną granicę fizjologicznego stężenia tego nukleozydu poza komórką, może być spowodowane niedotlenieniem lub niedokrwieniem tkanek<sup>(6)</sup>.

**Receptory A<sub>1</sub>** związane są z podrodziną białek G: G<sub>i(1-3)</sub> i G<sub>o</sub>. Za ich pośrednictwem hamowana jest aktywność cykazy adenylanowej<sup>(4,6)</sup>. Receptory mogą powodować otwarcie kilku typów kanałów potasowych oraz zamykać część kanałów wapniowych.

**Receptory A<sub>2A</sub> i A<sub>2B</sub>** związane są z białkami G<sub>s</sub> i za ich pośrednictwem aktywują cyklazę adenylanową, powodując wzrost w komórce cyklicznego adenozynomonofosforanu (cAMP)<sup>(6)</sup>. Nie wiadomo, czy pobudzenie receptora A<sub>2A</sub> daje odmienne rezultaty od pobudzenia receptora A<sub>2B</sub>. Jednakże oba podtypy różnią się właściwościami farmakologicznymi i występowaniem. W OUN receptor A<sub>2B</sub> jest szeroko rozpowszechniony, natomiast receptory A<sub>2A</sub> stwierdzono tylko w regionach dopaminergicznych mózgu.

**Receptory A<sub>3</sub>** 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 znacznie mniejsza niż pozostałych<sup>(5,6)</sup>.

Receptory adenozytowe są szeroko rozpowszechnione w układzie nerwowym<sup>(4,6)</sup>. Są związane z błonami komórkowymi neuronów, komórek glejowych i komórek śródbłonna mózgowych naczyń krwionośnych. Najczęściej spotykany jest receptor A<sub>1</sub>. Jest on obecny w błonach synaptycznych neuronów takich struktur mózgowych, jak: kora mózgowa, hipokamp, mózdzek, rdzeń kręgowy oraz wzgórze i prążkowie<sup>(4,6)</sup>. Podtyp A<sub>2A</sub> 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<sup>(5,6)</sup>. Natomiast nieznaczne ilości mRNA receptora A<sub>2B</sub> wykryto w takich rejonach mózgu, jak: kora mózgowa, hipokamp, mózdzek, wzgórze, podwzgórze i prążkowie<sup>(6)</sup>. Z kolei obecność mRNA receptora A<sub>3</sub> stwierdzono w hipokampie, podwzgórze i wzgórzu szczura<sup>(6)</sup>. W warunkach fizjologicznych stężenie pozakomórkowej adenozyliny (ektoAdo) wynosi 0,3-300 nM, a w niedotlenieniu mózgu stężenie Ado może wzrosnąć nawet stukrotnie<sup>(5,6)</sup>. Ektoadenozyna w warunkach fizjologicznych oraz po stymulacji receptorów, np. NMDA, pochodzi głównie z pozakomórkowej degradacji nukleotydów<sup>(6)</sup>. Niektórzy autorzy uważają, że w warunkach patologicznych, np. w niedotlenieniu, adenozylina powstaje

w komórce w wyniku degradacji ATP, a następnie jest uwalniana do synapsy<sup>(6)</sup>. 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<sup>(5,6)</sup>. Badania eksperymentalne wskazują, że drgawki znacznie podwyższają stężenie adenozyiny w mózgu i płynie mózgowo-rdzeniowym, co stwierdza się już w 30-60 s po napadzie drgawkowym<sup>(7)</sup>. Badania Winn i wsp. wykazały, że w ciągu 30 sekund od początku napadu drgawkowego wywołanego bikukulina u szczurów wzrasta mózgowy przepływ krwi (*cerebral blood flow*, CBF)<sup>(7)</sup>. Zmiany te korelowały z podwyższonym stężeniem adenozyiny w tkance nerwowej. Stężenie adenozyiny wzrastało w ciągu 10 sekund od początku drgawek i utrzymywało się przez 120 sekund przy prawidłowej (PaO<sub>2</sub> = 100 mm Hg) lub podwyższonej (PaO<sub>2</sub> = 200 mm Hg) prężności tlenu<sup>(7)</sup>. Sugeruje to, że adenozyina uczestniczy w regulacji mózgowego przepływu krwi w czasie napadu drgawkowego<sup>(7)</sup>. Mechanizmem ochraniającym neurony podczas napadu padaczkowego jest hamowanie przez adenozyinę wydzielania nie tylko glutamianu i asparaginianu, ale także acetylocholiny, noradrenaliny, dopaminy i kwasu gamma-aminomasłowego (GABA). Proces ten odbywa się za pośrednictwem receptorów A<sub>1</sub> i zapobiega ekscytotoksyczności<sup>(4,6,8,9)</sup>. Adenozyina, aktywując receptory presynaptyczne A<sub>1</sub>, hamuje napływ jonów Ca<sup>2+</sup> do komórki przez zależne od napięcia kanały wapniowe. W następstwie tego dochodzi do inhibicji uwalniania glutamianu. Aktywacja postsynaptycznych receptorów A<sub>1</sub> powoduje zmniejszenie pobudliwości błony postsynaptycznej oraz jej hiperpolaryzację, co zwiększa przewodność błony komórkowej dla jonów K<sup>+</sup> i zmniejsza dla jonów Ca<sup>2+</sup>. 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 adenozyiny.

### 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 neuroprotekcijną<sup>(10)</sup>.

### POTENCJALNA ROLA PRZECIWDRGAWKOWA AGONISTÓW RECEPTORÓW ADENOZYNOWYCH

W tym rozdziale przedstawimy wyniki eksperymentów wskazujących, że agoniści receptorów A<sub>1</sub> są skutecznymi związkami przeciwdrgawkowymi w wielu modelach padaczki eksperymentalnej

u zwierząt. Powyższe związki skutecznie hamowały drgawki wywołane przez leptazol, bikukulina, pikrotoksynę, NMDA, kwas kainowy, pilokarpinę i przez aktywator kanałów wapniowych Bay k-8644<sup>(11)</sup>. Analogi receptorów A<sub>1</sub> są również skuteczne w wygaszaniu drgawek w modelu drgawek rozniecanych, padaczki eksperymentalnej (*kindling*) i w drgawkach wywołanych hipoksją i prądem elektrycznym<sup>(11)</sup>.

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 glutamianu i przemianę katecholamin. Kwas walproinowy wybiórczo zwiększa stężenie GABA w synapsach oraz zmniejsza zużycie GABA przez komórki glejowe i zakończenia nerwowe poprzez hamowanie aminotransferazy GABA i dehydrogenazy semialdehdowej. Karbamazepina działa jako agonista receptorów A<sub>1</sub><sup>(12)</sup>.

Leki nowej generacji można podzielić na trzy klasy:

- leki przedłużające inaktywację kanałów sodowych, co zapobiega depolaryzacji komórki (okskarbazepina, lamotrygina, topiramata i gabapentyna);
- 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<sub>A</sub>);
- leki działające przez receptory glutaminowe – felbamat blokuje czynność receptora NMDA, topiramata blokuje receptor AMPA.

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

Do uzyskania efektu przeciwdrgawkowego niezbędny jest wzrost stężenia większy niż fizjologiczne adenozyiny 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 adenozyiny<sup>(12)</sup>.

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

Stwierdzono, że niektórzy agoniści receptorów adenozyinowych, jak 2-chloroadenozyina i 1-PIA (1-fenylizopropyladenozyna) – agonista receptorów A<sub>1</sub>, oraz NECA (5'-N-etylkarboksamidoadenozyina) – agonista receptorów A<sub>2</sub>, potęgują działanie niektórych leków przeciwpadaczkowych przy ich niezmiennym stężeniu we krwi<sup>(12,13)</sup>. Również APNEA [N<sup>6</sup>-2-(4-aminofenyl)etyl-adenozyna], selektywny agonista receptorów A<sub>3</sub>, uczestniczących w aktywacji apoptozy komórek, podany łącznie z karbamazepiną okazał się skutecznym środkiem przeciwdrgawkowym w padaczce eksperymentalnej<sup>(12)</sup>.

W modelu padaczki lekoopornej u myszy podanie karbamazepiny nie wpływa na wygaszenie drgawek, jednak dootrzewnowe podanie selektywnego agonisty receptorów  $A_1$  – 2-chloro-N6-cyclopentyladenosine (CCPA; 1,5 lub 3 mg/kg) wygasilo w ciągu 3,5 godziny zmiany napadowe w zapisie EEG<sup>(14)</sup>.

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<sup>(15,16)</sup>. W obu przypadkach podanie specyficznego agonisty receptorów  $A_1$  R-PIA [*R(-)N6-(2-phenyl-isopropyl)adenosine*], jak i niespecyficznego agonisty receptorów adenozytowych  $A_1/A_2$  2-CADO (2-chloroadenozyzna) przed iniekcją środka wywołującego drgawki zapobiegało rozwojowi drgawek, a ponadto obniżało śmiertelność powodowaną przez drgawki<sup>(15)</sup>.

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<sup>(11)</sup>. Napady drgawkowe obserwuje się także u dorosłych, np. w przebiegu udaru niedokrwiennego mózgu czy zatrzymaniu oddechu i krążenia<sup>(11)</sup>. Dlatego na uwagę zasługują badania Zgodzińskiego i wsp. nad wpływem agonistów i antagonistów receptorów adenozytowych na drgawki wywoływane u myszy przez niedotlenienie, które spowodowało drgawki u 90% badanych zwierząt<sup>(11)</sup>. Zwierzęta te w późniejszym okresie życia wykazywały wzrost skłonności do drgawek. Podanie R-PIA – agonisty receptora  $A_1$  – przed niedotlenieniem wydłużyło znacznie, zależnie od dawki, okres utajenia drgawek. Efekt ten znosił antagonist receptorów  $A_1$  – CPT (8-cyclopentylthiofilina). Wyniki te pokazują, że agoniści receptorów  $A_1$  skutecznie hamują powstawanie i zmniejszają skłonność badanych zwierząt do drgawek. Rezultaty uzyskane w tej samej pracowni wskazują, że również agonista receptorów  $A_2$  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 agoniści receptorów  $A_{2A}$  jest niezrozumiałe, gdyż wiadomo, że pobudzenie receptorów  $A_{2A}$  przez niespecyficznymi agonistami tych receptorów powoduje wzrost pozakomórkowego stężenia glutaminianu i acetylcholinu. 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  $A_1$ <sup>(11)</sup>. Wyjaśnienie mechanizmu działania wyżej omawianych związków wymaga dalszych badań.

#### POTENCJALNA ROLA PRZECIWDRGAWKOWA ENZYMÓW DEGRADUJĄCYCH NUKLEOTYDY I NUKLEOZYDY

Zlokalizowane w błonie komórkowej transportery białkowe adenozyzny, przenosząc ten nukleozyd do komórki, obniżają jego stężenie w przestrzeni pozakomórkowej. Ektoadenozyzna z udziałem deaminazy adenozyzny (ADA) jest metabolizowana

do ektoinozyzny<sup>(4,6,17)</sup>. Stężenie adenozyzny w komórkach OUN jest regulowane głównie przez aktywność kinazy adenozyzny (AKA), która obniża stężenie adenozyzny, używając jej jako substratu w syntezie AMP (adenozynomonofosforan)<sup>(4,6,17)</sup>. Badania immuno-histochemiczne mózgu wykazały, że aktywność kinazy jest rozmieszczona równomiernie we wszystkich strukturach mózgu, głównie w neuronach i astrocytach opuszki węchowej, prądkowia i pnia mózgu<sup>(18)</sup>. Wzrost ekspresji kinazy adenozyzny w hipokampie myszy po napadach drgawkowych wywołanych wstrzyknięciem kwasu kainowego może sugerować jej udział w powstawaniu napadu drgawkowego<sup>(19)</sup>. Jednak w warunkach patologicznych w komórce obserwuje się obniżoną aktywność kinazy adenozyzny. W tym przypadku główną drogą przemian adenozyzny jest deaminacja adenozyzny do inozyzny z udziałem deaminazy adenozyzny<sup>(4)</sup>.

Istniejące mechanizmy transportu biernego regulują poziom adenozyzny, tak że wyrównują stężenia tego związku po obu stronach błony komórkowej<sup>(6)</sup>. W takim razie każde obniżenie stężenia tego nukleozydu w komórce spowoduje zmniejszenie stężenia adenozyzny poza komórką. Efektem będzie obniżenie progu drgawkowego. Dowodzi to, że istotną funkcję w hamowaniu czynności drgawkowej mogą pełnić inhibitory transportu adenozyzny (np. dipirydamol czy propentofilina). Zahamowanie transportu adenozyzny do komórki spowoduje akumulację adenozyzny podanej parenteralnie, co wraz z wysoką aktywnością ekto-5'-nukleotydyazy hydrolyzującej ektoAMP do ektoadenozyzny spowoduje gwałtowny wzrost stężenia adenozyzny poza komórką<sup>(6)</sup>. Rosnące stężenie adenozyzny, aktywując receptory  $A_1$ , podwyższy próg drgawkowy. Dipirydamol jest już stosowany jako lek, który hamuje wychwyty zwrotny adenozyzny. Lek ten łącznie z kwasem acetylosalicylowym (Aggrenox) jest skutecznie stosowany w profilaktyce udaru niedokrwiennego mózgu<sup>(20)</sup>. Inny bloker wychwyty zwrotnego – propentofylina, antagonist receptorów  $A_1$  i  $A_{2A}$  przez inhibicję aktywności fosfodiesterazy wykazuje działanie neuroprotektoryjne w różnych modelach niedotlenienia mózgu<sup>(4)</sup>. Być może inne związki o podobnym mechanizmie działania mogłyby być skutecznymi lekami przeciwdrgawkowymi.

Adenozyzna poza komórką może ulegać deaminacji do inozyzny z udziałem deaminazy ektoadenozyzny. Zatem enzym ten obniża stężenie Ado i tą drogą uwalnia receptory adenozynowe (P1) od ich naturalnego agonisty. W wielu regionach mózgu aktywność deaminazy adenozyzny poza komórką jest bardzo niska, a niektóre są jej pozbawione<sup>(6)</sup>. Również w naczyniach krwionośnych aktywność ADA jest niewielka w porównaniu z aktywnością hydrolaz ektonukleotydów purynowych<sup>(6)</sup>. 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 adenozyzny 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 adenozyzny działa neuroprotektoryjnie<sup>(19)</sup>.



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<sup>(17)</sup>. Ponadto aktywność E-NTPD-azy 1 w hipokampie i korze skroniowej u ludzi z padaczką jest obniżona<sup>(17)</sup>. 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 adenozyiny<sup>(17)</sup>.

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

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

Agoniści adenozyiny i antagoniści glutaminianu są czynnikami przeciwdrgawkowymi, podczas gdy antagoniści adenozyiny i agoniści glutaminianu sprzyjają powstawaniu drgawek<sup>(10)</sup>. Neuroprotekcjne działanie egzogennej guanozyiny i nukleotydów guanozynowych wykazano *in vitro* i *in vivo*<sup>(10,23)</sup>. Stwierdzono, że nukleotydy guaninowe (GTP, GDP i GMP) działają neuroprotekcjnie w ekscytotoksyczności wywołanej kainianem i NMDA<sup>(24)</sup>. Guanozyna i adenozyna oraz układ glutaminergiczny oddziałują wzajemnie na siebie. Pozakomórkowe nukleotydy guaninowe, a w mniejszym stopniu guanozyna, wywierają wpływ na transmisję glutaminergiczną. Związki te, hamując wiązanie ligandów receptorów glutaminergicznych, modulują odpowiedź komórkową na glutaminian i jego analogi oraz ekscytotoksyczność<sup>(23)</sup>. Glutaminian stymuluje wydzielanie adenozyiny, która, działając poprzez presynaptyczne receptory A<sub>1</sub>, hamuje uwalnianie glutaminianu<sup>(10,23)</sup>. Natomiast guanozyna w stężeniu 1 μM uwalniana z udziałem kainianu zwiększa wychwyt zwrotny glutaminianu przez astrocyty<sup>(10,23)</sup>. Guanozyna podobnie jak adenozyna chroni mózg narażony na

niedotlenienie i hipoglikemię oraz zapobiega degradacji neuronów powodowanej przez niekontrolowaną stymulację receptorów NMDA (ekscytotoksyczność)<sup>(10,23)</sup>.

W badaniach Schmidta i wsp. udowodniono, że dootrzewnowe podanie GMP i guanozyiny myszom zapobiega drgawkom wywołanym przez kwas chinolinowy (agonistę receptorów NMDA) wywołujący drgawki u wszystkich badanych zwierząt<sup>(23)</sup>. Przeciwnie dootrzewnowe podanie antagonisty NMDA – MK-801 – zapobiegało występowaniu drgawkom u 100% badanych zwierząt<sup>(23)</sup>. Podanie guanozyiny i GMP na 10, 30 i 60 minut przed kwasem chinolinowym zapobiegło powstaniu drgawek aż u 70-80% badanych myszy<sup>(23)</sup>. W celu wyeliminowania ewentualnego udziału receptorów adenozyinowych w tym procesie, badania prowadzono w obecności kofeiny (nieselektywnego antagonisty receptorów adenozyinowych) podanej dootrzewnowo przed kwasem chinolinowym<sup>(23)</sup>. Kofeina nie hamowała prewencyjnego działania guanozyiny na drgawki wywołane przez kwas chinolinowy, co dowodzi, że receptory adenozyinowe A<sub>1</sub> i A<sub>2A</sub> nie są zaangażowane w ten proces. Protekcjne działanie guanozyiny 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<sup>(23)</sup>. Powstawaniu drgawek zapobiegał tylko fenobarbital, agonista receptorów GABA<sub>A</sub>. W drgawkach wywołanych kainianem guanozyna również nie wpływała na zmianę progu drgawkowego i nie obniżała w sposób istotny statystycznie śmiertelności zwierząt<sup>(23)</sup>. Badania behawioralne nad zwierzętami wykazały, iż efekt unikania osiągnięto przez dootrzewnowe podanie guanozyiny w dawce 1-7,5 mg/kg, podczas gdy adenozyna powodowała podobny efekt w stężeniu 100-1000 mg/kg<sup>(10)</sup>. Na udział pochodnych guaniny w modulacji procesów transmisji sygnałów w OUN wskazuje również obecność w błonach komórkowych mózgu szczurów miejsc o wysokim powinowactwie do guanozyiny i niezależna od receptorów adenozyinowych stymulacja przez guanozynę wychwyty zwrotnego glutaminianu<sup>(10)</sup>. Dokomorowa aplikacja analogów GTP, GDP i GMP także zapobiegła powstawaniu drgawkom wywołanych przez kwas chinolinowy<sup>(23)</sup>. Sądzimy iż podane dokomorowo nukleotydy guaninowe są hydrolizowane do guanozyiny przez egzoNTPD-azy znajdujące się w płynie mózgowo-rdzeniowym<sup>(25)</sup>. Nukleotydy nie przenikają przez błony neuronów, jedynie nukleozydy są transportowane przez barierę krew-mózg, jak również błony komórkowe z udziałem przekaźników 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 nukleotydów i nukleozydów guaninowych.

Ogromną zaletą guanozyiny jest przeciwdrgawkowa skuteczność doustnie podanego nukleozydu. Wykazano bowiem, że guanozyna podana tą drogą myszom zapobiegała

drgawkom wywołanym przez kwas chinolinowy, drgawkom i śmiertelności wywołanej przez  $\alpha$ -dendrotoksynę (czynnik uwalniający glutaminian), jak również potencjalnej toksyczności kainianu wywołanej przez MK-801 (bloker kanałów NMDA)<sup>(10)</sup>. Jednakże podawana w ten sposób guanozyna nie wpływała na drgawki wywołane przez kainian lub pikrotoksynę – antagonistę GABA<sub>A</sub><sup>(10)</sup>. Skuteczność doustnie podanej guanozyny wynika z istnienia w komórkach jelit, w naczyniach włosowatych mózgu oraz barierze krew-mózg mechanizmów pozwalających na transport nukleozydów<sup>(10)</sup>.

## 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 neuroprotektoryjne. 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 adenozytowych A<sub>1</sub> i/lub blokada receptorów A<sub>2A</sub> jest skutecznym sposobem przerywania napadu drgawkowego.
2. Adenozyzna, jak również antagoniści receptorów A<sub>2A</sub> zmniejszają uwalnianie neurotransmiterów w OUN, więc najlepszy efekt przeciwdrgawkowy i neuroprotektoryjny będzie można uzyskać, stosując jednocześnie agonistę receptorów A<sub>1</sub> i antagonistę receptorów A<sub>2A</sub>.
3. Istniejący synergizm działania agonistów receptorów adenozytowych i leków przeciwpadaczkowych na czynność drgawkową oraz wpływ konwencjonalnych leków przeciwpadaczkowych na transmisję purynergiczną wskazuje, że ich łączne stosowanie pozwoli na bardziej skuteczne hamowanie czynności drgawkowej, a także na obniżenie dawki leku przeciwpadaczkowego.
4. Należy jednak pamiętać, że poważnym ograniczeniem zastosowania klinicznego agonistów receptorów adenozytowych jest ich działanie obwodowe powodujące obniżenie ciśnienia krwi, temperatury i bradykardię. Być może związki podobne do nowych selektywnych agonistów A<sub>1</sub> pozbawionych działania obwodowego, takie jak NNC 21-0041 i NNC 21-0136 o silnym działaniu neuroprotektoryjnym, wykażą równie skuteczne właściwości przeciwdrgawkowe.
5. Związki podnoszące stężenie endogennej adenozyminy, a więc związki hamujące degradację adenozyminy (inhibitory deaminazy i kinazy adenozyminy) oraz hamujące wychwyty zwrotny nukleozydów mogą również okazać się skutecznymi lekami przeciwdrgawkowymi.
6. Skutecznymi lekami przeciwdrgawkowymi mogą być także związki aktywujące ektoenzymy (E-NTPD-azę 1 i 5'-nukleo-

tydazę) hydrolizujące nukleotydy adeninowe i w ten sposób zwiększające stężenie ektoadenozyminy.

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:

### BIBLIOGRAPHY:

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 adenozyminy w procesach neurodegeneracyjnych. *Neurol. Neurochir. Pol.* 2002; 36: 329-336.
6. Romanowska M., Komoszyński M.: Adenozyzna – neuroprzekaznik 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.: N<sup>6</sup>-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-Chloroadenosine, 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 A(1) 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., Żylewska 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 nukleotydów i nukleozydów 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 pentylentetrazol 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.

W dniach 7-8 kwietnia 2011 r. Katedra Neuropsychologii Klinicznej Collegium Medicum w Bydgoszczy oraz Wydawnictwo FORUM organizują konferencję naukową:

## Neuropsychiatria i Neuropsychologia w Medycynie

Kierownikiem Komitetu Naukowego konferencji jest **Prof. Alina Borkowska**.

- Podczas konferencji zostaną omówione m.in. następujące zagadnienia:
  - Neurobiologia funkcji psychicznych
  - Neuropsychologia w neurochirurgii
  - Neuropsychologia w chorobach somatycznych
- Neuropsychologiczne aspekty chorób układu sercowo-naczyniowego
  - Neuropsychologia procesów decyzyjnych
- Farmakoterapia dysfunkcji poznawczych w chorobach neurologicznych

Szczegóły dotyczące konferencji znajdują Państwo na stronie internetowej:

[www.neuropsychologia2011.pl](http://www.neuropsychologia2011.pl)

### Komitet naukowy:

Prof. Alina Borkowska  
 Prof. Marek Harat  
 Prof. Jerzy Samochowiec  
 Prof. Andrzej Tretyn  
 Prof. Marcin Wojnar  
 Prof. Jerzy Vetulani

### Biuro organizacyjne:

Wydawnictwo FORUM Sp. z o.o.  
 ul. Polska 13  
 60-595 Poznań  
 tel.: 61 66 55 800  
 faks: 61 66 55 888  
 e-mail: [infolinia@e-forum.pl](mailto:infolinia@e-forum.pl)

