

## AZ 1-DEPRENYL HATÁSA A NORADRENERG TRANZMISSZIÓRA

TÖRÖK TAMÁS, az orvostudományok kandidátusa, BUNYEVÁ CZ ZSUZSANNA  
és MAGYAR KÁLMÁN, az orvostudományok doktora

Közlésre érkezett: 1982. VI. 18.

A deprenyl, a B típusú MAO szelektív gátlója (Knoll és Magyar 1972), komplex hatásspektrumú vegyület, mely jelentősen gátolja a catecholaminok felvételét, metabolitjai az amfetamin és metamfetamin fokozzák a catecholaminok felszabadulását és nagy adagban a catecholamin receptorokat direkt módon is gátolják (Knoll 1982). Jelenközleményünkben csak az utóbbi hatással foglalkoztunk. Ismeretes, hogy clorgylin, a MAO-A szelektív bénítója, nagy adagban direkt módon gátolja a szerotonin receptorokat (Knoll 1976), és a (-)deprenyl a terápiás adagnál  $50-100 \times$  nagyobb adagban direkt módon gátolja a dopamin receptorokat (Knoll 1978). Mi a nyúl izolált artéria pulmonálisán a deprenyl hatását alfa<sub>1</sub>- és alfa<sub>2</sub>- receptorokra vizsgáltuk. Jelen dolgozatban a kísérletsorozat eredményeit foglaltuk össze.

### Módszerek

#### <sup>3</sup>H-Noradrenalin-felszabadulás mérése

A <sup>3</sup>H-Noradrenalin (<sup>3</sup>H-NA) neuronális felszabadulását Borowski és mtsai (1977) módszerével mértük.

A nyúl megölése után a fő pulmonáris artériát kipreparáltuk, majd carbogénnel (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) telített Krebs oldatba helyeztük. A Krebs oldat összetétele: NaCl, 113 mM; KCl, 4,7 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM; CaCl<sub>2</sub>, 2,5 mM; MgSO<sub>4</sub>, 1,2 mM; NaHCO<sub>3</sub>, 25 mM; dextrose, 11,5 mM; aszkorbinsav, 0,3 mM; Na<sub>2</sub>EDTA, 0,03 mM; pargylin, 0,124 mM. Az oldatban levő aszkorbinsav és a Na<sub>2</sub>EDTA a NA stabilitását biztosítja, a pargylin a MAO-t irreverzibilisen gátolja, anélkül, hogy befolyásolná a <sup>3</sup>H-NA neuronális visszavételét. K<sup>+</sup>-mentes oldatot a KCl elhagyásával és a KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ekvimoláris NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-al való helyettesítésével készítettük. A preparátumot 1,5 ml carbogénizált Krebs oldatban 37 °C-on 30 percig inkubáltuk. Ezen idő alatt a szövet eredeti ioneloszlása (magas intracelluláris K<sup>+</sup>, illetve alacsony intracelluláris Na<sup>+</sup> helyreáll). Ezt követően 25 μl <sup>3</sup>H-NA-t (25 μCi) fecskendeztünk az oldathoz, melyben a preparátumot 45 percig állni hagytuk.

Ezután az artériát 2,0 ml térfogatú termosztált szervtartó edénybe helyeztük, egyik végét rögzítettük, másik végét pedig izometriás transzducerekhez csatlakoztattuk.

Az izmot perisztaltikus pumpa segítségével 8 ml/perc sebességgel 2—3 órán át mostuk karbogenizált Krebs oldattal (37 °C). A mosóoldat összetétele megegyezett a már ismertetettel, azzal a különbséggel, hogy pargylin helyett  $3 \times 10^{-5}$ M cocaint tartalmazott. A cocain gátolja a  $^3\text{H}$ —NA neuronális felvételét.

A szervtartó edényből az oldatot egy másik pumpa segítségével szívtuk el. Kb. 800 ml mosófolyadék átáramoltatása után a perfúziós sebességet 4 ml/percre csökkentettük és az oldathoz  $5 \times 10^{-5}$ M corticoszteront adtunk. A corticoszteron a NA extraneuronális felvételét gátolja. *Endo és mtsai (1977)* kimutatták, hogy pargylin, cocain és corticoszteron jelenlétében az ingerlésre felszabaduló NA 86%-a az általunk is használt feltételek mellett nem metabolizálódik.

20—30 perc elteltével a preparátumot a platina elektródok segítségével 3 perces négyszög impulzusokkal (2Hz; 1 msec; 60 V) ingereltük (field ingerlés). A perfuzátumot összegyűjtöttük és a radioaktivitást folyadékszintillációs módszerrel mértük (Beckman LS-9000). A 3 perces ingerlést követően két 3 perces frakciót gyűjtöttünk. A nyugalmi (ingerlés nélküli) tritium kiáramlást 6 perces frakciót három egymást követő frakcióban. Az ingerlés során a megnövekedett  $^3\text{H}$ —NA felszabadulás hatására az izom összehúzódott, melyet előerősítőn át direktíróval regisztráltunk. A kísérlet végén a preparátumot 0,1 mg pontossággal lemértük és 1 ml Soluene-ben (Soluene-100; Packard) oldottuk a maradék szöveti  $^3\text{H}$ —NA tartalom meghatározására.

Minden egyes frakcióból 1 ml-t 10 ml szcintillációs oldatba (TritonX-100 33% toluol; 0,5% PPO; 0,01% POPOP) tettünk. A szöveti mintából 50  $\mu\text{l}$ -t fecskendeztünk 10 ml szcintillációs oldatba.

A  $^3\text{H}$ —NA felszabadulást számítógépes program segítségével pmol/3 percben kaptuk meg.

#### *Mechanikai aktivitás mérése*

Az izom kontrakcióit izometriásan mértük a fent vázolt kísérleti feltételek mellett. A preparátumot finom szemészeti ollóval hosszanti irányba felnyitottuk, majd cérnával két ponton rögzítettük, úgy, hogy a körkörös izom hosszanti irányba helyezkedjen el. A kontrakciókat előerősítőn keresztül direktíróval (Servogor) regisztráltuk.

#### *Vegyületek*

(—/—/ $^3\text{H}$ )-noradrenalin, specifikus aktivitás: 15,9 Ci/mmol, 1 mCi/ml (Radiochemical Centre, Amersham, England); 1-NA (Fluka); yohimbin (Knoll AG); 1-deprenyl (fenil-izopropil-metil-propinilamin (Chinoin)).



## Eredmények

## Az 1-deprenyl pre- és poszt-szinaptikus hatása

Az 1-deprenyl  $10^{-6}$ M koncentrációban gyakorlatilag nem befolyásolta az ingerlésre létrejövő transzmitter felszabadulást ( $1,06 \pm 0,06$ ;  $n=3$ ).  $10^{-5}$ M deprenyl hatására a transzmitter felszabadulás már enyhén fokozódott ( $1,26 \pm 0,04$ ;  $n=3$ ),  $10^{-4}$ M deprenyl esetén pedig jelentősen nőtt ( $2,89 \pm 0,15$ ;  $n=8$ ). A hatás reverzibilis, kimosás után ugyanis a kontroll ingerlés hatására a  $^3\text{H}$ -NA felszabadulás az eredeti értékre csökkent. A nyugalmi NA felszabadulás 1-deprenyl hatására nem változott. Ismételt deprenyl-alkalmazás esetén a field ingerlés kisebb mértékű transzmitter felszabadulást hozott létre (deszenzibilizáció). Az 1-deprenyl bár  $10^{-4}$ M koncentrációban közel 200%-kal emelte a  $^3\text{H}$ -noradrenalin felszabadulását, ugyanakkor azonban gátolta az NA poszt-szinaptikus hatást (1. ábra). A simaizom kontrakciójának amplitúdója 30–40%-kal csökkent. A pre- és poszt-szinaptikus effektusban észlelt különbség az  $\alpha_1$ - és  $\alpha_2$ -receptor gátló phentolamin hatására emlékeztet (Langer 1979).

Az 1-deprenyl transzmittert felszabadító hatásának gátlása  $\alpha_2$ -agonistával

Ismeretes, hogy az idegvégződésből felszabaduló NA az  $\alpha_2$ -receptoron keresztül „negatív feed-back” mechanizmus révén gátolja saját felszabadulását (Langer 1974; 1977). A „negatív feed-back” fiziológiás szerepet játszik a transzmitter felszabadulás pre-szinaptikus szabályozásában. Jelen kísérleti

## 1. táblázat

Az 1-deprenyl és az 1-NA hatása a  $^3\text{H}$ -NA felszabadulásra nyúl pulmonáris artérián\*

Vegyület	Koncentráció (M)	Idegingerléssel** kiváltott $^3\text{H}$ -NA felszabadulás arányai*** ( $St_4/St_3$ )
1-deprenyl	$10^{-6}$	$1,06 \pm 0,06$ (3)
	$10^{-5}$	$1,26 \pm 0,04$ (3)
	$10^{-4}$	$2,89 \pm 0,15$ (8)
1-NA	$10^{-7}$	$0,56 \pm 0,08$ (5)
	$3 \times 10^{-7}$	□ $1,91 \pm 0,18$ (4)
		□ $0,33 \pm 0,08$ (5)
		□ $1,38 \pm 0,22$ (6)
		□ $0,21 \pm 0,12$ (4)
$10^{-6}$	□ $0,65 \pm 0,16$ (4)	

\* A  $^3\text{H}$ -NA felszabadulást pargylin ( $1,2 \times 10^{-4}$ M), cocain ( $3 \times 10^{-5}$ M) és corticosteron ( $5 \times 10^{-5}$ M) jelenlétében mértük

\*\* 2 Hz; 1 msec; 60 Volt

\*\*\*  $St_4/St_3$ ; átlag  $\pm$ S.E.; ( ): kísérletek száma

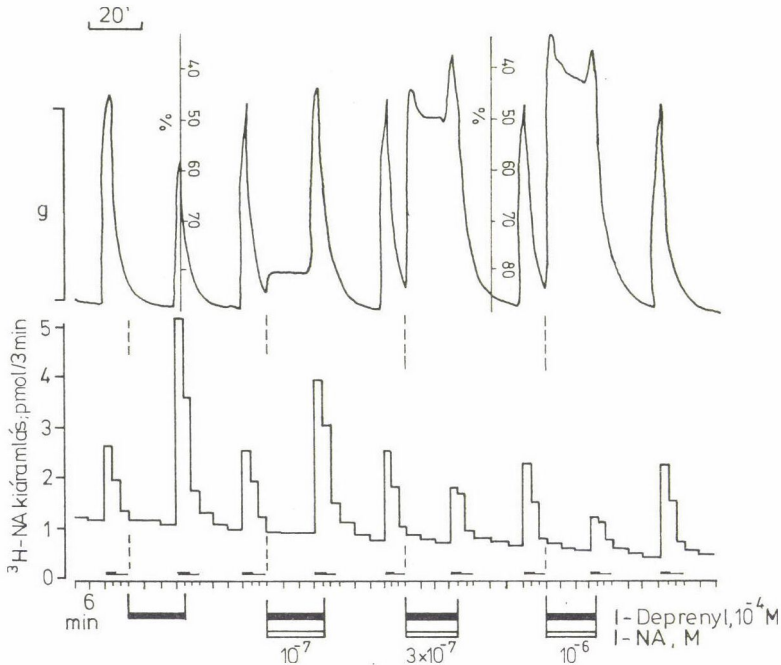
□  $+10^{-4}$ M 1-deprenyl

Az 1-deprenyl hatásának gátlása mindhárom NA koncentráció alkalmazása esetén szignifikáns ( $p < 0,001$ ).

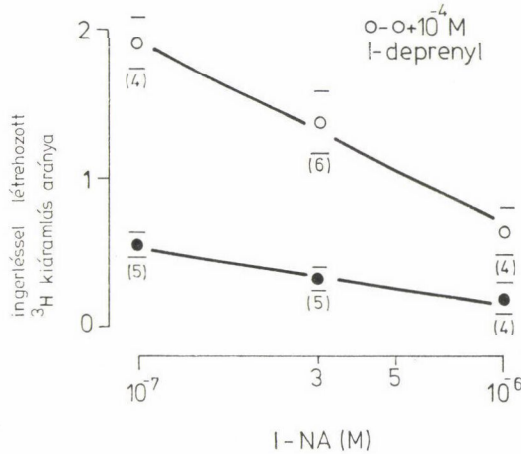
feltételeink mellett ez azt jelenti, hogy az ideg ingerlés (2 Hz) hatására mért transzmitter felszabadulás már eleve gátolt, mivel a NA a pre-szinaptikus  $\alpha_2$ -receptor izgatása révén gátolja a neurokémiai transzmissziót. A negatív feedback szerepét támasztja alá az a kísérletünk, melyben a szelektív  $\alpha_2$ -antagonista yohimbin (Starke és mtsai 1975a, b) hatására fokozott transzmitter felszabadulást észleltünk.  $3 \times 10^{-7} \text{M}$  yohimbin hatására ugyanis a  $^3\text{H}$ -NA aránya  $4,11 \pm 0,57$  ( $n=4$ ) volt. Az ideg ingerlés hatására felszabaduló NA azonban nem okoz 100%-os  $\alpha_2$ -receptor telítettséget, mivel exogén 1-NA hatására a transzmitter felszabadulás tovább csökken (1. táblázat).  $10^{-6} \text{M}$  1-NA az ideg ingerlés hatására létrejött NA felszabadulás arányát 1-ről  $0,21 \pm 0,12$  ( $n=4$ )-re csökkentette, a simaizmot pedig összehúzta, mely a poszt-szinaptikus  $\alpha_1$ -receptor depolarizációjának a következménye.

Kísérleteinkben választ kívántunk kapni arra a kérdésre, hogy az  $\alpha_2$ -receptor izgatása csökkenti-e az 1-deprenyl transzmittert felszabadító hatását.

Ennek eldöntésére az exogén 1-NA koncentrációját emeltük  $10^{-4} \text{M}$  1-deprenyl egyidejű alkalmazása mellett. Az 1. ábra és 1. táblázat a kapott eredményeket mutatja. Az 1. ábrából kitűnik, hogy az exogén NA koncentrá-



1. ábra. Az 1-deprenyl és az exogén 1-NA pre- és poszt-szinaptikus hatása. Alul: Ideg ingerlés (2 Hz) kiváltott  $^3\text{H}$ -NA felszabadulás pmol/3 percben kifejezve. Felül: A simaizom kontrakciói izometriásan mérve. Megjegyzés:  $10^{-4} \text{M}$  1-deprenyl fokozta a transzmitter felszabadulást és gátolta a poszt-szinaptikus hatást. Az 1-NA ( $10^{-7} \text{M}$ – $10^{-6} \text{M}$ ) koncentrációtól függően gátolta az 1-deprenyl  $^3\text{H}$ -NA-t felszabadító hatását és az izmot összehúzta. A vegyületeket 18 perccel a field ingerlés előtt alkalmaztuk



2. ábra. Koncentráció hatás-összefüggés. Abszcissa: az exogén 1-NA moláris koncentrációi logaritmikus léptékben; ordináta: az ideg ingerléssel (2Hz) kiváltott  $^3\text{H}$ -NA felszabadulás arányai ( $\text{St}_4/\text{St}_3$ ) lineáris léptékben. ●-●: 1-NA; ○-○: 1-NA +  $10^{-4}\text{M}$  1-deprenyl; átlag  $\pm$  S.E.; (n): kísérletek száma. Megjegyzés: Az 1-NA gátolta a field ingerléssel létrehozott transzmitter felszabadulást 1-deprenyl hiányában és jelenlétében. Mindkét görbe lineáris.

ciójának emelésével párhuzamosan csökken az 1-deprenyl  $^3\text{H}$ -NA-t felszabadító hatása. Az ábrán jól látható az 1-NA poszt-szinaptikus hatása, nevezetesen, a simaizom tónusa a koncentráció emelésével párhuzamosan nő.  $3 \times 10^{-7}\text{M}$  1-NA a transzmitter felszabadulás arányát 1-ről  $0,33 \pm 0,08$ -ra ( $n=5$ ) és a deprenyl hatását a  $2,89 \pm 0,15$  ( $n=8$ ) arányról  $1,38 \pm 0,22$  ( $n=6$ )-ra csökkentette (1. táblázat). A gátlás szignifikáns ( $p < 0,001$ ).

A 2. ábra a koncentráció-hatás összefüggését mutatja. Mind a kontroll transzmitter felszabadulás, mind pedig az 1-deprenyl  $^3\text{H}$ -NA-t felszabadító hatása az exogén NA koncentrációjának emelésére lineárisan csökken.

#### Az 1-deprenyl transzmittert felszabadító hatásának $\text{Na}^+$ -pumpa függősége

Ismeretes, hogy a  $\text{Na}^+$ -pumpa fiziológiai szerepet játszik a transzmitter felszabadulás pre-szinaptikus szabályozásában (Paton és mtsai 1971; Vizi 1972; Baker és Crawford 1975; Wakade 1981). A  $\text{Na}^+$ -pumpát  $\text{K}^+$ -megvonással gátoltuk.  $\text{K}^+$ -mentes közegben, mind a nyugalmi, mind pedig az ideg ingerlésre kiváltott transzmitter felszabadulás nőtt. A maximális  $^3\text{H}$ -NA felszabadulás 45 perccel a  $\text{K}^+$ -megvonása után jött létre (arány:  $5,39 \pm 0,54$ ;  $n=6$ ). Az  $\text{Na}^+$ -pumpa gátlása során az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció nő (Baker és mtsai 1967), mely feltehetően a membrán ATP-áz gátlása révén fokozza a transzmitter felszabadulást (Vizi 1977). Az ilyen körülmények között alkalmazott 1-deprenyl ( $10^{-4}$ ) szignifikánsan tovább fokozta az ideg ingerléssel kiváltott transzmitter kiáramlását (arány:  $8,76 \pm 1,61$ ;  $n=4$ ;  $0,02 < p < 0,05$ ).



### Megbeszélés

Az (-)deprenyl (Jumex) fokozza a levodopa hatását, ezért ma széles körben felhasználják a Parkinson-kór kezelésére. Az egyetlen MAO bénító, mely mentes a többi vegyület tiramin-potencirozó hatásától. Ezért biztonságosan alkalmazható hipertóniás krízis veszélye nélkül levodopával együtt adva és dietáris megszorításra sincs szükség (Birkmayer és Riederer 1980). Állatkísérletekben a szelektív MAO—B bénító adat 0,1 mg/kg, mely megfelel az emberen alkalmazott átlagos dózishoz (napi 5—10 mg). A terápiás szint kb.  $10^{-6}$ M-nak felel meg, és ez a koncentráció miként a dopaminerg receptorokat, úgy — jelen vizsgálataink szerint — a noradrenerg receptorokat sem befolyásolja direkt módon. A noradrenerg receptorokat gátló hatás csak a terápiásnál nagyobb koncentrációban jelentkezik.

Elméleti szempontból érdekesnek tűnik, hogy a deprenyl nagy dózisban ( $10^{-4}$ M) úgy hat, mint egyes alfa-szimpatolitikumok, mint pl. a phentolamin, mely a pre-szinaptikus alfa<sub>2</sub>-receptor gátlása révén fokozza a transzmitter felszabadulást, továbbá, a poszt-szinaptikus alfa<sub>1</sub>-receptor antagonizálása révén gátolja az általa felszabadított transzmitter hatását (Langer 1979). Az alfa<sub>2</sub>-receptor agonista l-NA felfüggesztette a deprenyl <sup>3</sup>H—NA-t felszabadító effektusát. Az alfa<sub>2</sub>-receptor gátolja a Ca-vezetőképességét (McAfee és mtsai 1981). A katecholaminok membrán ATP-ázt aktiváló hatása jól ismert (Yoshimura 1973), mely alfa-receptoron keresztül valósul meg (Gilbert és mtsai 1975) és Ca-függő (Godfraind és mtsai 1974). Így jogosnak tűnik az a feltételezés, hogy az l-NA a Ca-vezetőképesség gátlása révén függeszti fel az l-deprenyl transzmitter felszabadító hatását. A Ca<sup>2+</sup>-ról tudjuk, hogy kulcsszerepet játszik a transzmitter-felszabadulásban (Blaustein 1979), továbbá, hogy gátolja a (Na—K) ATP-ázt, mely hatás a membrán belső felszínére lokalizálódik (Skou 1965).

Fenti elképzelésünket támasztja alá az a kísérleti tény is, mely szerint az alfa<sub>2</sub>-receptor antagonistá yohimbin jelentősen fokozza a NA felszabadulást, mely valószínűleg kapcsolatban áll a Ca-influx növekedésével.

A Na<sup>+</sup>-pumpa gátlása során a Na<sup>+</sup>-grádiens csökken, mely fokozott Ca<sup>2+</sup>-belépést eredményez (Baker és mtsai 1967; Vizi 1972; Baker és Crawford 1975) és transzmitter felszabadulást hoz létre (Bonaccorsi és mtsai 1977; Nakazato és mtsai 1978; Wakade 1981). Mivel az l-deprenyl ilyen körülmények között is szignifikánsan fokozta a NA felszabadulást, feltételezzük, hogy nagy adag deprenyl a Ca<sup>2+</sup>-pumpa (Schatzmann 1966; 1973) gátlása révén hozza létre jellegzetes pre-szinaptikus hatását.

## Összefoglalás

(-)Deprenyl hatását vizsgáltuk nyúl izolált artéria pulmonálisán. Azt találtuk, hogy a terápiás adagoknak megfelelő koncentrációban ( $10^{-6}$ M) a (-)deprenyl számottevően nem befolyásolja a pre- és poszt-szinaptikus noradrenerg receptorok működését. A terápiás adagnál nagyobb dózisban ( $10^{-4}$ M) a deprenyl gátolta a noradrenerg receptorokat.

## IRODALOM

- Baker, P. F., Blaustein, M. P., Hodgkin, A. L. és Steinhardt, R. A.: J. Physiol. London, **192**, 43P (1967).
- Baker, P. F. és Crawford, A. C.: J. Physiol. London, **247**, 209 (1975).
- Birkmayer, W. és Riederer, P.: Die Parkinson-Krankheit. Biochemie, Klinik, Therapie. Springer-Verlag, Wien, New York (1980).
- Blaustein, M. P.: In: The release of catecholamines from adrenergic neurones (Ed. By D. M. Paton), Pergamon Press, 39 (1979).
- Bonaccorsi, A., Hermsmeyer, K., Smith, C. B. és Bohr, D. F.: Am. J. Physiol. **232**, 140 (1977).
- Borowski, E., Starke, K., Ehrl, H. és Endo, T.: Neurosci., **2**, 285 (1977).
- Endo, T., Starke, K., Bangerter, A. és Taube, H. D.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. **296**, 229 (1977).
- Gilbert, I. C., Wyllie, M. G. és Davison, D. V.: Nature, **255**, 237 (1975).
- Godfraind, T., Koch, M. C. és Verbeke, N.: Biochem. Pharmacol. Vol. **23**, 3505 (1974).
- Knoll, J.: In: Monoamine Oxidase and Its Inhibition. G. E. W. Wolstenholme and J. Knight (eds.). Ciba Foundation Symposium 39 (new series) Elsevier, Amsterdam, p. 135 (1976).
- Knoll, J.: J. Neural Transm., 3., **43**, 177 (1978).
- Knoll, J.: Orvosi Hetilap **123**, 1335 (1982).
- Knoll, J. és Magyar, K.: Adv. Biochem. Psychopharmacol., **5**, 393 (1972).
- Langer, S. Z.: Biochem. Pharmac. **23**, 1793 (1974).
- Langer, S. Z.: Br. J. Pharmacol. **60**, 481 (1977).
- Langer, S. Z.: In: The release of catecholamines from adrenergic neurons. (Ed.: D. M. Paton.) Pergamon Press, 59 (1979).
- McAfee, D. A., Henon, B. K., Horn, J. P. és Yarowsky, P.: Fed. Proc. **40**, 2246 (1981).
- Nakazato, Y., Ohga, A. és Onoda, Y.: J. Physiol. London, **278**, 45 (1978).
- Paton, W. D. M., Vizi, E. S. és Zar, M. S.: J. Physiol. London, **215**, 819 (1971).
- Schatzmann, H. J.: Experientia **22**, 364 (1966).
- Schatzmann, H. J.: J. Physiol. London **235**, 551 (1973).
- Skou, J. C.: Physiol. Rev. **45**, 596 (1965).
- Starke, K., Borowski, E. és Endo, T.: Eu. J. Pharmacol. **34**, 385 (1975a).
- Starke, K., Endo, T. és Taube, H. D.: Nature, **254**, 440 (1975b).
- Vizi, E. S.: J. Physiol. London **226**, 95 (1972).
- Vizi, E. S.: J. Physiol. London **267**, 261 (1977).
- Wakade, A. R.: J. Physiol. London, **313**, 481 (1981).
- Yoshimura, K.: Biochem. J. **74**, 389 (1973).