

EGY ÚJ ADAMANTÁN-SZÁRMAZÉK
(P-BRÓM-BENZOIL-METIL-ADAMANTILAMIN)
K⁺ CSATORNA BLOKKOLÓ HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA
EMLŐS ÉS BÉKASZÍVEN

MÉSZÁROS JÁNOS, KELEMEN KÁROLY, MARKÓ RAISA,
KECSKEMÉTI VALÉRIA és SZEGI JÓZSEF

Debreceni Orvostudományi Egyetem Gyógyszertani Intézete, Debrecen
és Semmelweis Orvostudományi Egyetem Gyógyszertani Intézete, Budapest

Az első adamantánt 1933-ban LANDA izolálta kőolajból. Jóval később, 1964-ben DAVIES és mtsai kimutatták, hogy a vegyület aminoszármazéka anti-virális hatással rendelkezik. Néhány évvel később, 1969-ben SCHWAB és mtsai egy véletlen folytán fedezték fel ugyanennek a vegyületnek az antiparkinson hatását, amikor azt influenza megelőzésére adták egy Parkinson-kóros betegnek. Ezt követően indult meg az adamantánok széles körű farmakológiai vizsgálata. Több új változatát is kidolgozták. Legismertebbé a nálunk Viregyt néven forgalomba került, adamantánamin hidroklorid vált, melyről irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy fokozza a dopamin bioszintézisét és felszabadulását az idegrendszerben, (HEIMANS és mtsai 1972, SCATTON és mtsai 1970), továbbá, hogy csökkenti a posztzinaptikus membrán acetilkolin érzékenységet ideg-izom preparátumokon (NASTUK és mtsai 1976). Egy másik adamantán-származékról (dimetilamino-adamantán) kimutatták, hogy emeli a sejtmembrán ellenállását és csökkenti a repetitív spike-aktivitást patkány érző neuronon (GROSSMANN és mtsai 1976).

Az elmúlt években a Kossuth Lajos Tudományegyetem Szerves Kémiai Tanszékén, az EGYT Gyógyszergyár megbízásából, SZTARICSKAI és mtsai (1975) több új adamantán-származékot állított elő. Ezek közül vizsgáltuk meg néhányának a szívizom elektrofiziológiai sajátságaira kifejtett hatását.

Módszerek

Kísérleteinkben a transzmembrán akciós potenciálokat intracelluláris mikroelektrod technika segítségével, izolált tengerimalac bal pitvari izom valamint jobb kamrai papilláris izom preparátumokon, macska jobb kamrai papilláris izmon és nyúl izolált sinus csomóján mértük. A 3 M KCl-dal töltött üveg-mikroelektrodák ellenállása 5–10 megohm között váltakozott. A biopotenciálokat MIKI-1623 típusú erősítővel erősítettük és oszcilloszkóp (EMG-1555) képernyőjéről fotorekorder segítségével fényképeztük. Az akciós potenciálok felfutó szárának időszerinti első deriváltját (dV/dt ; \dot{V}_{max}) elektronikus diffe-

renciátorral képeztük (KELEMEN és mtsai 1968). A preparátumokat, a spontán működő nyúl sinus-csomó kivételével, elektromosan ingereltük 2 Hz frekvenciával, 1 msec időtartamú, 3-szoros küszöbfezültségű négyszög impulzusokkal, platina felületi elektródákon keresztül.

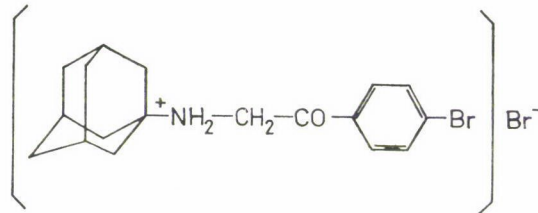
A mechanikai aktivitást izolált tengerimalac bal pitvari izmon mértük, izometrikus transzducer segítségével. A kontrakciókat oszcilloszkóp képernyőjéről fényképeztük.

A kísérleteket 37 °C-on, jól oxigenált (95% O₂ és 5% CO₂ gázkeverékkel) Krebs oldatban végeztük. A Krebs oldat összetétele (mM): NaCl, 118; KCl, 4,7; CaCl₂, 2,5; NaH₂PO₄, 1,0; MgCl_{2,1,2}; NaHCO₃, 24,9; glukóze, 11,5.

A transzmembrán ionáramokat kettős sucrose-gap elrendezésen alapuló voltage clamp technikával, béka pitvari rostokon mértük (ROUGIER és mtsai 1968, KELEMEN és mtsai 1980). A kísérleteket az alábbi összetételű Ringer oldatban végeztük (mM): NaCl, 112; KCl, 1,33; CaCl₂, 0,9; NaHCO₃, 1,2.

Eredmények és megbeszélés

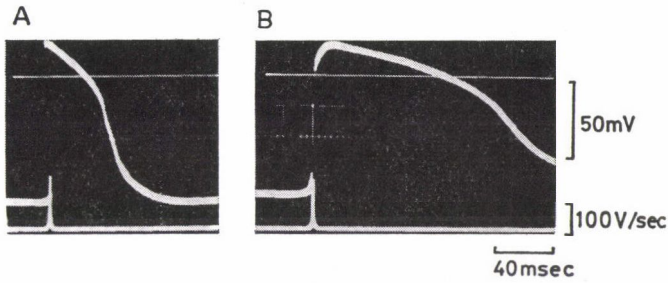
A vizsgált adamantán-származék (p-bróm-benzoil-metil-adamantilamin hidrobromid; BMA) (EGYT) szerkezeti képletét az 1. ábra szemlélteti.



1. ábra. Az adamantán szerkezeti képlete. Kémiailag: 1-N-/p-brom-benzoil/-metil-adamantilamin hidrobromid. (BMA)

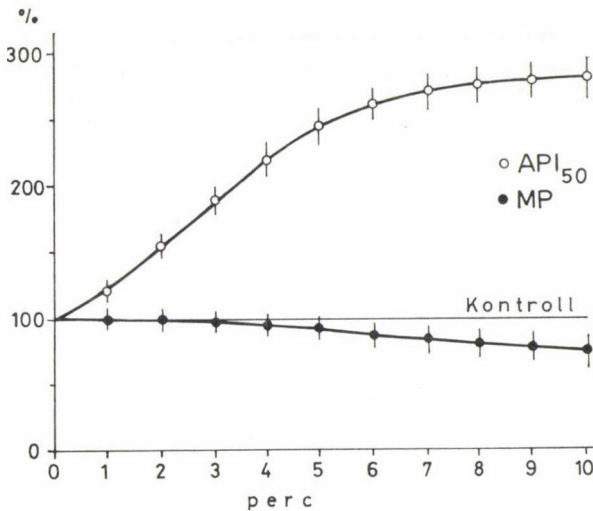
1. BMA hatása a normál akciós potenciálokra és a kontraktilitásra

A 2. ábra mutatja a BMA (10⁻⁴ M) hatását izolált tengerimalac bal pitvari myocardium transzmembrán akciós potenciáljaira. Az ábrán jól megfigyelhető a BMA legjellemzőbb hatása, az akciós potenciál repolarizációs fázisának extrém módon történő elnyújtása. A vegyület ebben a koncentrációban az akciós potenciál 50%-os repolarizációnál mért időtartamát átlagosan a kontroll érték 360%-ára nyújtja. Az overshoot-ot nem változtatja meg, viszont egy kismértékű depolarizáció megfigyelhető és valószínűleg ennek tulajdonítható a \dot{V}_{\max} 10%-os csökkenése. A repolarizáció késleltetése időben mnđ megelőzi a membránpotenciál csökkenését (3. ábra).

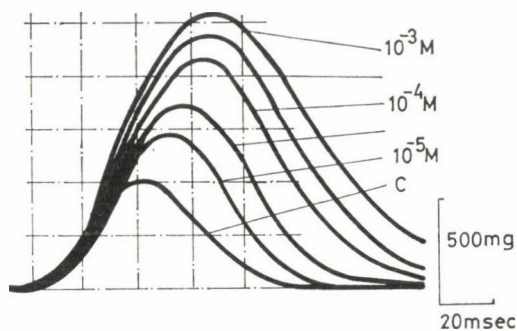


2. ábra. BMA hatása tengerimalac bal pitvari myocardium transzmembrán akciós potenciáljára. A: kontroll akciós potenciál és annak felfutási meredeksége. B: 10⁻⁴ M BMA hatása. A felső kihúzott vonal a nulla feszültség szintet jelzi

Megvizsgáltuk a BMA hatását izolált, elektromosan ingerelt tengerimalac bal pitvari myocardium mechanikai aktivitására. Megállapítottuk, hogy a vegyület koncentráció-függő pozitív inotróp hatással rendelkezik (4. ábra). A kontrakciók amplitúdója a kontroll érték 240%-ára emelkedik, míg a maximális erő kifejlődéséhez szükséges idő fokozódik, a relaxációs idő elnyúlik. Ezek az eredmények, melyek jó összhangba hozhatók az elektrofiziológiai mérések eredményeivel, nevezetesen az akciós potenciál időtartamának az elnyúlásával, arra engednek következtetni, hogy a BMA elsődleges hatása a repolarizációért felelős, kifelé irányuló K ionáram gátlása, míg a pozitív inotróp hatás az ennek következtében megnövekedett nettó Ca²⁺ influx eredménye.

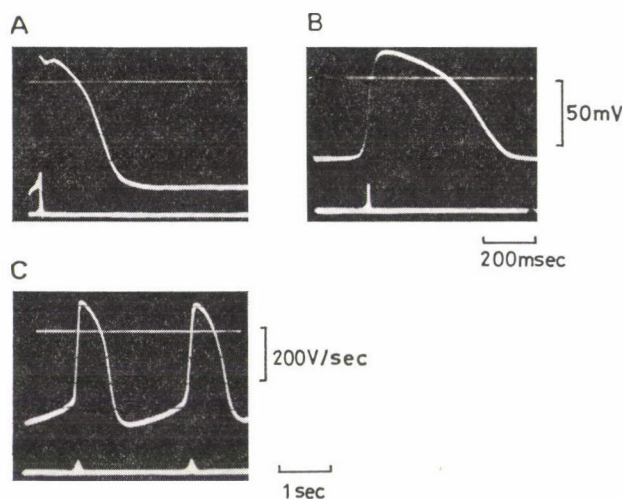


3. ábra. Az akciós potenciál időtartamának és a membránpotenciál változása az idő függvényében BMA (10⁻⁴ M) kezelés alatt. API₅₀: az akciós potenciál időtartama 50%-os repolarizációnál mérve, PM: membránpotenciál. Átlag ± S. E. (n = 7)



4. ábra. A BMA koncentráció-függő hatása tengerimalac bal pitvari myocardium kontrakcióira. C: kontroll

A BMA kamrai hatásait macska izolált, elektromosan ingerelt jobb kamrai papilláris izmain tanulmányoztuk. A vegyület ezen a preparátumon is koncentráció-függő módon (5×10^{-5} – 10^{-4} M) erősen elnyújtotta az akciós potenciálok időtartamát. A membránpotenciált -80 mV-ról kb. -60 mV-ra csökkentette, ennek következtében a \dot{V}_{\max} 160 V/sec-ről 20 – 40 V/sec-ra csökkent. Érdekes módon 10^{-4} M BMA hatására a munkaizomzatban spontán (elektromos ingerlés nélkül) pacemaker-típusú akciós potenciálok sorozata jelent meg kb. $30/\text{min}$ frekvenciával, melyek diasztolés depolarizációval és overshoot-tal rendelkeznek és csak a BMA kimosása után szűnnek meg (5. ábra). Ez a jelen-

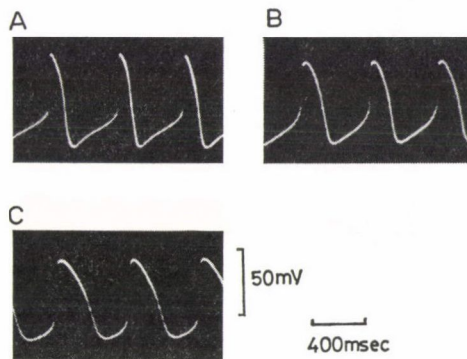


5. ábra. A BMA koncentráció-függő hatása macska papilláris izom transzmembrán akciós potenciáljára. A: kontroll, B: 5×10^{-5} M BMA, C: 10^{-4} M BMA indukálta spontán pacemaker-típusú akciós potenciálok. Az időkalibráció az A és B képeken azonos, de a C-nél eltérő

ség beta-adrenoceptor blokkoló pindolol (10^{-6} M) jelenlétében is megfigyelhető. A pacemaker potenciálok megjelenése összefüggésben van a BMA okozta K-permeabilitás csökkenésével. TRAUTWEIN és KASSEBAUM (1961) igazolta, hogy a pacemaker potenciálok diasztolés depolarizációját a K-permeabilitás csökkenése eredményezi. Ezen a depolarizált membránpotenciál szinten a gyors Na ionáram már inaktiválódik, míg a lassú Ca ionáram itt kezd aktiválódni, ezért feltételezhető, hogy az akciós potenciálok felfutó szárát inkább a lassú Ca ionáram hozza létre, mint a gyors Na ionáram (WEIDMANN 1955). Irodalmi adatokból ismeretes, hogy más K-antagonista szer, pl. a Ba²⁺ is képes automaticitást indukálni emlős myocardiumban (CARMELIET és mtsai 1976). Korábbi dolgozatainkban egy másik adamantán-származékról (diadamantil-etiléndiamin), mely erősen csökkenti a ⁴²K-effluxot béka kamrai myocardiumon, már kimutattunk hasonló hatást (MÉSZÁROS 1978, MÉSZÁROS és mtsai 1981b).

2. BMA hatása természetes pacemaker potenciálokra

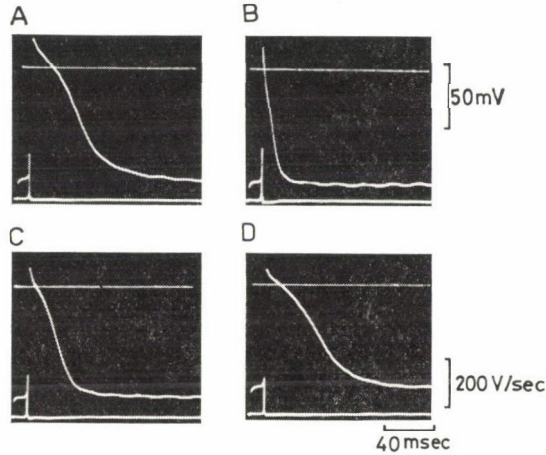
Miután megállapítottuk, hogy az adamantán automaticitást indukál kamrai munkaizomzatban, érdekesnek látszott megvizsgálni, milyen hatása van az igazi pacemaker sejtek aktivitására. A kísérleteket izolált, spontán működő nyúl szinus-csomón végeztük. A legmeglepőbb eredmény az volt, hogy az elektromos aktivitás frekvenciája változatlan marad, annak ellenére, hogy a BMA okozta küszöbpotenciál csökkenése a frekvencia emelkedéséhez kellene, hogy vezessen. Magyarózatul szolgál azonban a BMA másik hatása, a pacemaker akciós potenciálok repolarizációs idejének az elnyújtása, mely frekvencia csökkenéshez vezet. A két mechanizmus kompenzálja egymást, ezért nem változik meg a szinuszsejtek elektromos aktivitásának frekvenciája (6. ábra).



6. ábra. A BMA koncentráció-függő hatása a pacemaker potenciálokra izolált nyúl szinusz csomón. A: kontroll, B: 5×10^{-5} M BMA, C: 10^{-4} M BMA

3. BMA hatása acetilkolin mellett

Mivel az eddigi eredmények azt mutatják, hogy a BMA szelektív K-csatorna blokkoló hatással rendelkezik, megvizsgáltuk, vajon képes-e antagonizálni a közismert K-csatorna aktivátor acetilkolin (ACh) (TEN EICK és mtsai 1976) hatásait. A kísérleteket izolált, elektromosan ingerelt tengerimalac bal pitvari myocardiumon végeztük. A szerveket először 5×10^{-6} M ACh-val kezeltük. Az ACh a repolarizációért felelős K ionáram extrém módon történő



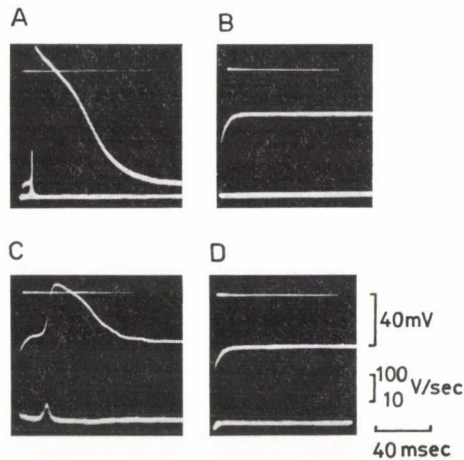
7. ábra. BMA hatása tengerimalac pitvari akciós potenciálokra, acetilkolin (ACh) jelenlétében. A: kontroll, B: 5×10^{-6} M ACh, C: 5×10^{-5} M BMA, D: 10^{-4} M BMA. Az ACh a kísérlet ideje alatt végig jelen volt

felgyorsítása által tüskeszerűen beszűkítette az akciós potenciálokot (7. B. ábra). Ezt a hatást a BMA koncentráció-függő módon (5×10^{-5} – 10^{-4} M) antagonizálja (7. C és D ábra).

4. BMA hatása K-depolarizált myocardiumon

Általánosan elfogadott, hogy azok az anyagok, amelyek a K-konduktanciát csökkentik, ún. „lassú” akciós potenciálokot indukálnak K-depolarizált rostokon, ahol a gyors Na csatorna a depolarizáció következtében feszültség-inaktiválódott (PAPPANO 1970, 1976, EHARA és INAZAWA 1980). Kísérleteinkben az izolált tengerimalac bal pitvari myocardium membrán kb. -80 mV-os nyugalmi potenciálját kb. -40 mV-ra csökkentettük a Krebs oldat K tartalmának 26 mM-ra történő emelésével. A preparátum ingerelhetetlenné vált (8. B. ábra). Még extrém magas (10 -szeres küszöbfeszültségű) ingerre sem válaszolt tovaterjedő akciós potenciálokkal. Az inger frekvenciát $0,5$ Hz-re csökkentettük. A módszer részletes leírását korábbi dolgozatainkban adtuk meg

(KECSKEMÉTI 1978, MÉSZÁROS és mtsai 1981a). Ilyen körülmények között, 10⁻⁴ M BMA, még a beta-blokkoló pindolol (10⁻⁶ M) jelenlétében is képes lassú akciós potenciálokat kiváltani (8. C. ábra), melyek 2 μM D-600-zal (Ca csatorna blokkoló) teljes mértékben antagonizálhatók (8. D. ábra). Feltételezzük, hogy a BMA lassú akciós potenciálokat kiváltó hatása inkább tulajdonítható a K-depolarizáció során fellépő ún. shunt-konduktancia (McDONNALD és TRAUTWEIN 1978) gátlásának, mint a lassú Ca csatorna foszforiláció-függő aktiválásának. Hasonló megállapítást tettek a Ba²⁺ esetében EHARA és INAZAWA



8. ábra. Lassú akciós potenciálok kiváltása BMA-val, K-depolarizált tengerimalac pitvari myocardiumon. A: normál akciós potenciál, B: 26 mM K⁺ tartalmú Krebs oldat a membránt depolarizálja és ingerelhetetlenné teszi, C: 10⁻⁴ M BMA lassú akciós potenciálokat indukál. D: 2 μM D-600 (Ca csatorna blokkoló verapamil-származék) megszünteti a lassú akciós potenciálokat. A, ill. C képeken a V_{max} kalibrációja különböző

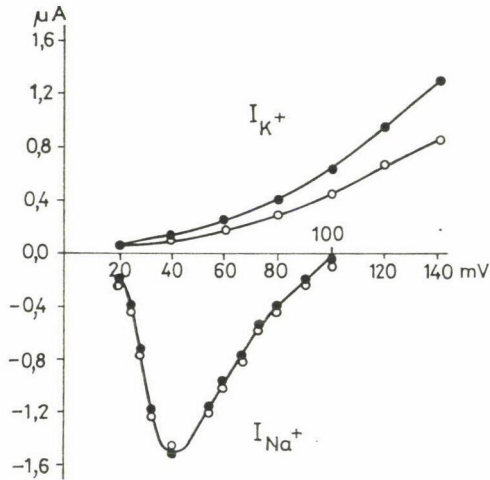
(1980). PAPPANO (1970) feltételezése szerint két különböző mechanizmus létezik a lassú akciós potenciálok kiváltására K-depolarizált rostokon: 1. a befelé irányuló Ca ionáram fokozása, 2. a kifelé irányuló K ionáram gátlása.

5. BMA hatása a transzmembrán ionáramokra

A BMA hatásmechanizmusának további tisztázása céljából voltage clamp kísérleteket végeztünk béka pitvari rostokon, kettős sucrose-gap technika alkalmazásával. A módszer lehetővé teszi a vegyület transzmembrán ionáramokra gyakorolt hatásának közvetlen tanulmányozását. A kísérletek egyik csoportjában, a lassú Ca csatorna 2 mM Mn²⁺ tartalmú Ringer oldattal történő blokkolása után, megvizsgáltuk a BMA (10⁻⁴ M) hatását a befelé irányuló gyors Na ionáramra. A membránt a -75 mV-os holding potenciálról lépésenként négyszög impulzusokkal depolarizálva és az egyes depolarizáló pulzusok

által kiváltott tranziens áram jelek nagyságát a pulzus elején lemérve, felvettük az áram-feszültség karakterisztika görbét BMA adás előtt és után. A 9. ábra alsó része (I_{Na^+}) mutatja, hogy a kontroll (fekete körök) és a BMA (10^{-4} M) perfúziója alatt felvett karakterisztika görbe (üres körök) egybeesik, ami arra enged következtetni, hogy voltage clamp körülmények között a BMA nem hat a gyors Na ionáramra. A grafikonon a -75 mV-os holding potenciált a nulla pont reprezentálja.

A kísérletek másik csoportjában megvizsgáltuk a BMA (10^{-4} M) hatását a kifelé irányuló K ionáramra. A kísérleteket a gyors Na és a lassú Ca ionára-



9. ábra. BMA (10^{-4} M) hatása a béka pitvari rostok kettős sucrose-gap voltage clamp technikával mért transzmembrán ionáramaira. I_{K^+} : kifelé irányuló K ionáram. Az ionáram nagyságát az 1500 msec időtartamú depolarizáló pulzusok végén mértük. A kísérleteket Na és Ca mentes kolin-Ringerben végeztük. I_{Na^+} : befelé irányuló gyors Na ionáram. A tranziens áram nagyságát a depolarizáló pulzusok elején mértük. A kísérleteket 2 mM Mn^{2+} tartalmú Ringer oldatban végeztük. Abszcissa: depolarizáló clamp lépések mV-ban. Nulla pont: -75 mV-os holding potenciál. Ordináta: a transzmembrán ionáramok nagysága μA -ben. A negatív előjel az áram befelé haladását jelzi. Fekete körök: kontroll, Üres körök: 10^{-4} M BMA hatása

mok kizárása céljából, Na és Ca mentes, izotóniás kolin-Ringerben végeztük és extrém hosszú, 1500 msec időtartamú depolarizáló voltage clamp pulzusokat alkalmaztunk. Ebben az esetben a steady-state áram nagyságát a pulzus végén mértük le. A 9. ábra felső részén (I_{K^+}) látható, hogy a BMA jelentősen csökkenti a kifelé irányuló K ionáram nagyságát.

Voltage clamp kísérleteink eredményei egyértelműen igazolják azt a feltevezésünket, hogy a BMA szelektív K csatorna blokkoló hatással rendelkezik mind emlős, mind béka myocardiumon. Hasonló szelektív K csatorna blokkoló hatást írtak le más szerzők, más kvaterner ammónium ionok esetében. HILLE (1967) kimutatta, hogy a tetraetilammónium ion blokkolja a K ionáramot béka

idegroston, de nem hat a gyors Na ionáramra. KENYON és GIBBONS (1979) megállapították, hogy a 4-aminópiridin, egy másik kvaterner ammónium ion, csökkenti a steady-state K ionáramot de nem hat a lassú Ca ionáramra szív Purkinje rostoson. YANAGISAWA és TAIRA (1979) azt találta, hogy a 4-aminópiridin elnyújtja az akciós potenciál időtartamát és növeli a kontrakciók amplitúdóját kutyá kamrai myocardiumon. Ezt a jelenséget a K-permeabilitás csökkenésével magyarázták.

Összefoglalás

Megvizsgáltuk egy új adamantán-származék, a p-brom-benzoil-metiladamantilamin (BMA) hatását emlős szívizom preparátumok transzmembrán potenciáljaira és kontraktilitására, valamint békaszív pitvari rostok transzmembrán ionáramaira.

Megállapítottuk, hogy a BMA 10^{-5} – 10^{-4} M koncentráció tartományban szelektív K csatorna blokkoló hatással rendelkezik. Ezt támasztják alá a következő kísérleti adatok: 1. a vegyület extrém módon késlelteti az akciós potenciál repolarizációját, 2. pacemaker aktivitást indukál kamrai munkai-zomzatban, mely alapmechanizmusa bizonyítottan a K-permeabilitás csökkenése, 3. lassú akciós potenciálokat indukál K-depolarizált rostokon, ami inkább tulajdonítható a depolarizáció okozta shunt-konduktancia csökkentésének, mint a lassú Ca csatorna foszforiláció-függő aktiválásának, 4. voltage clamp kísérletekben csökkenti a kifelé irányuló K ionáram nagyságát, de nem hat sem a gyors Na, sem a lassú Ca ionáramokra.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetet mondanak Dr. Dinya Zoltánnak (KLTE, Szerves Kémiai Tanszék, Debrecen) az adamantán rendelkezésükre bocsájtásáért.

IRODALOM

- CARMELIET, E., XHONNEUX, R., VAN GLABBECK, A. and RENEMAN, R.: *Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol.* **293**, 57 (1976).
- DAVIES, V. L., GRUNERT, R. R., HAFF, R. F., MCGAHEN, J. W., NEUMAYER, E. M., PAULSHOCK, M., WATTS, J. C., WOOD, T. R., HERMANN, E. C. and HOFFMANN, C. E.: *Science* **144**, 862 (1964).
- EHARA, T. and INAZAWA, M.: *Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol.* **315**, 47 (1980).
- GROSSMANN, A., GROSSMANN, W. and JURNA, I.: *Eur. J. Pharmacol.* **35**, 379 (1976).
- HEIMANS, R. L. H., RAND, M. J. and FENNESSY, M. R.: *J. Pharm. Pharmacol.* **24**, 875 (1972).
- HILLE, B.: *J. Gen. Physiol.* **50**, 1287 (1967).
- KECSKEMÉTI, V.: *J. Pol. Pharmacol. Pharm.* **30**, 377 (1978).
- KELEMEN, K., MARKÓ, R., KECSKEMÉTI, V. and KNOLL, J.: In: „Prostanoids” (*Advances in Pharm. Res. Pract.*, Vol. VI) Ed.: Kecskeméti V. and Knoll J. Pergamon Press and Akadémiai Kiadó, Budapest pp. 89–94 (1980).

- KELEMEN, K., KECSKEMÉTI, V., SCULTÉTY, L. and FRIEDMANN, T.: *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* **33**, 269 (1968).
- KENYON, J. L. and GIBBONS, W. S.: *J. Gen. Physiol.* **73**, 139 (1979).
- LANDA, S.: *Chem. Listy.* **27**, 415 (1933).
- MCDONALD, T. F. and TRAUTWEIN, W.: *J. Physiol.* **274**, 217 (1978).
- MÉSZÁROS, J.: *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* **51**, 155 (1978).
- MÉSZÁROS, J., KECSKEMÉTI, V. and SZEGI, J.: *Eur. J. Pharmacol.* **74**, 181 (1981a).
- MÉSZÁROS, J., KOVÁCS, T., DINYA, Z. and SZEGI, J.: *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* **58**, (1981b) in press.
- NASTUK, W. L., SU, P. C. and DOUBILET, P.: *Nature* **264**, 76 (1976).
- PAPPANO, A. J.: *Circ. Res.* **27**, 379 (1970).
- PAPPANO, A. J.: *Circ. Res.* **39**, 99 (1976).
- ROUGIER, O., VASSORT, G. and STÄMPFEL, R.: *Pflügers Arch.* **301**, 91 (1968).
- SCATTON, B., CHERAMY, A., BESSON, M. J. and GŁOWINSKI, J.: *Eur. J. Pharmacol.* **13**, 131 (1970).
- SCHWAB, R. S., ENGLAND, A. C., POSKANZER, D. C. and YOUNG, R. R.: *J. Amer. Med. Assoc.* **208**, 1168 (1969).
- SZTARICKAI, F., PELYVÁS, I., DINYA, Z., SZILÁGYI, L., GYÖRGYDEÁK, Z., HADHÁZI, GY., VÁCZI, L. und BOGNÁR, R.: *Pharmazie* **30**, 571 (1975).
- TEN EICK, R., NAWRATH, H., McDONALD, T. F. and TRAUTWEIN, W.: *Pflügers Arch.* **361**, 207 (1976).
- TRAUTWEIN, W. and KASSEBAUM, D. G.: *J. Gen. Physiol.* **45**, 317 (1961).
- WEIDMANN, S.: *J. Physiol.* **127**, 213 (1955).
- YANAGISAWA, T. and TAIRA, N.: *Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol.* **307**, 207 (1979).