

## EKSPERIMENTINIAI TYRIMAI

### $I_{K_{ACH}}$ slopiklis 2-[(4-metilfenil)sufonilkarbamido]-1-(4-nitrobenzil) piridinio bromidas (2-AP27) yra muskarino $M_2$ receptorių antagonistas

Vytenis Arvydas Skeberdis, Vida Gendvilienė, Danguolė Zablockaitė,  
Irma Martišienė, Antanas Stankevičius

Kauno medicinos universiteto Kardiologijos institutas

**Raktažodžiai:** miokardo ląstelės, karbacholis, adenosinas, sulfonilkarbamidinis 2-amino-piridino darinys 2-AP27, L-tipo  $Ca^{2+}$  srovė.

**Santrauka.** Aminopiridiniai yra žinomi acetilcholino aktyvintos kalio srovės ( $I_{K_{ACH}}$ ) slopikliai. Tyrėme, ar 2-aminopiridino sulfonilkarbamidinio darinio 2-AP27 anticholinerginis poveikis varlės miokardo ląstelių izoprenalinu stimuliuotai L-tipo  $Ca^{2+}$  srovei yra sąlygotas šio junginio savybe blokuoti muskarino  $M_2$  receptorių.

Izoliuotų miokardo ląstelių L-tipo  $Ca^{2+}$  srovę ( $I_{CaL}$ ) registruojame fiksuotos įtampos metodu.  $\beta_1$ - $\beta_2$  – adrenoreceptorių agonistas izoprenalinas ( $0,1 \mu M$ ) padidino miokardo ląstelių  $I_{CaL}$  iki  $475 \pm 61$  proc. ( $n=4$ ) ( $p<0,05$ ) palyginus su kontrole.  $M_2$  muskarino receptorių agonistas karbacholis ( $0,01 \mu M$ ) sumažino ją iki  $42 \pm 15$  proc. palyginus su  $I_{CaL}$  dydžiu veikiant izoprenalinui. 2-aminopiridino darinys 2-AP27 ( $100 \mu M$ ) šiomis sąlygomis padidino  $I_{CaL}$  iki  $95 \pm 5,8$  proc., t. y. visiškai panaikino slopinamąjį karbacholio poveikį. Kitoje eksperimentų serijoje  $A_1$ -adenozino receptorių agonistas adenosinas ( $1 \mu M$ ) izoprenalinu stimuliuotą  $I_{CaL}$  sumažino iki  $56 \pm 10$  proc. ( $n=3$ ) ( $p<0,05$ ). Veikiant 2-AP27 ( $100 \mu M$ ) junginiui, adenosino sumažinta  $I_{CaL}$  išliko beveik nepakitusi ir buvo  $51 \pm 7,9$  proc. ( $n=3$ ) ( $p<0,05$ ) palyginus su  $I_{CaL}$  dydžiu veikiant izoprenalinui. Šie rezultatai rodo, kad 2-aminopiridino darinys 2-AP27, kurio amino grupė pakeista 4-toluolsulfonilkarbamido fragmentu, ir piridino azotas, kvaternizuotas 4-nitrobenzilo bromidu, yra muskarino  $M_2$  receptorių antagonistas.

#### Įvadas

Eksperimentiniai ir klinikiniai tyrimai rodo, kad, stimuliuojant miokardo ląstelių muskarino  $M_2$  receptorių, ar padidėjus parasimpatinės nervų sistemos aktyvumui, didėja išeinanti iš ląstelių  $K^+$  srovė ( $I_{K_{ACH}}$ ) per aktyvuotus  $K_{ACH}$  kanalus, o tai sukelia miokardo ląstelių veikimo potencialų (VP) trukmės sumažėjimą, refrakterinio laikotarpio sutrumpėjimą bei prieširdžių fibriliaciją ir tachiaritmijas (1–3). Daugelį metų širdies ritmui reguliuoti vartojami III klasės antiaritminiai *d,l*-sotalolas, amiodaronas, 2- ar 4-aminopiridiniai, kurie slopina įtampa valdomų kalio kanalų srovę, taip pat pasižymi anticholinerginėmis, t. y.  $K_{ACH}$  kanalus blokuojamosiomis savybėmis (4, 5). Tačiau šie vaistai, ilgindami VP trukmę, repolarizacijos fazę bei QT intervalą ir lėtindami laidumą, gali sukelti *reentry* tipo aritmijas ir polimorfinę skilvelių tachikardiją (pranc. *torsades de pointes*) (6, 7). Be to, dėl neselektyviai

blokuojamų įvairių tipų  $K^+$  kanalų jie gali sukelti daug kitų nepageidaujamų reakcijų (8, 9). Ieškodami veiksmingų ir selektyvių preparatų, reguliuojančių jonų kanalų, lemiančių miokardo ląstelių veikimo potencialų repolarizaciją bei trukmę ir refrakterinį laikotarpį, KMU Kardiologijos instituto mokslininkai sintetino naujus 2-aminopiridino darinius, prijungę 4-toluolsulfonilkarbamido fragmentą prie piridino žiedo (junginys 2-AP21) ir papildomai kvaternizavę piridino žiedo azotą metilo jodidu (2-AP22 junginys), alilo bromidu (2-AP26) arba 4-nitrobenzilo bromidu (2-AP27 junginys).

Anksčiau mūsų atlikti eksperimentiniai šių junginių poveikio tyrimai jūrų kiaulytės prieširdžių VP-ų trukmei ir susitraukimo jėgai aktyvintų muskarino  $M_2$  receptorių ir  $K_{ACH}$  kanalų sąlygomis parodė, kad šie junginiai pasižymi anticholinerginėmis savybėmis, t. y. didina šių receptorių agonisto karbacholio suma-

Adresas susirašinti: V. Gendvilienė, KMU Kardiologijos institutas, Sukilėlių 17, 50161 Kaunas

El. paštas: membiof@kmu.lt

žintą prieširdžių VP-ų trukmę ir susitraukimo jėgą (10). Efektyviausiu anticholinerginiu poveikiu pasižymėjo 2-AP27 junginys, t. y. 2-AP darinys su 4-toluolsulfonilkarbamido fragmentu, kuriame piridino žiedo azotas kvaternizuotas 4-nitrobenzilo bromidu. Tačiau tiksli šio junginio veikimo vieta nežinoma.

Muskarino  $M_2$  receptorių stimuliavimas šių receptorių agonistais karbacholiu ar iš poganglinių skaidulų išsiskyrusiu acetilcholinu, padidėjus parasimpatinės nervų sistemos tonusui ar dirginant klajoklį nervą, aktyvina  $G_i$  baltymus ir jų valdomus  $K_{ACh}$  kanalus. Dėl to padidėja  $K^+$  srovė per šiuos kanalus ( $I_{KACh}$ ) bei sumažėja veikimo potencialų trukmė (1, 2, 5, 11). Taigi, sulfonilkarbamidinis 2-aminopiridino darinys 2-AP27 galėjo arba tiesiogiai blokuoti muskarino  $M_2$  receptorių, arba  $K_{ACh}$  kanalus, arba slopinti kokliušo (*pertussis*) toksinui jautrų  $G_i$  baltymo aktyvumą.

Žinoma, kad, perduodamas signalą per  $G_i$  baltymus, karbacholis ar acetilcholinai slopina adenilciklazės aktyvumą, todėl mažėja cAMP gamyba, L-tipo  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų fosforilinimas ir  $\text{Ca}^{2+}$  jonų srovė per šiuos kanalus ( $I_{CaL}$ ) bei nuo jos priklausoma susitraukimo jėga (2, 12). Todėl vienas iš būdų nustatyti 2-AP27 junginio veikimo vietą yra izoliuotų miokardo ląstelių izoprenalinu aktyvintos L-tipo  $\text{Ca}^{2+}$  srovės matavimas, veikiant muskarino  $M_2$  ir kito tipo su  $G_i$  baltymais susijusių receptorių (pvz., adenosino receptorių  $A_1$ ) agonistams bei tiriamajai 2-AP27 medžiagai. Todėl tyrėme 2-AP27 junginio įtaką varlės miokardo ląstelių izoprenalinu stimuliuotai L-tipo  $\text{Ca}^{2+}$  srovei, ją slopindami karbacholiu per  $M_2$  receptorių arba adenosinu – per adenosino  $A_1$  receptorių.

### Tyrimo medžiaga ir metodai

#### Varlės širdies ląstelių izoliavimas

Vienetiniai varlės (*Rana temporaria*) širdies kardiomiocitai išskiriami fermentinio izoliavimo metodu. Varlės širdis izoliuojama prieš tai specialia adata suardžius jos stuburo ir galvos smegenis. Petri lėkštelėje, pripildytoje atšaldytu ir deguonimi įsotintu izoliuojamuoju tirpalu (mM) – NaCl 113, KCl 2,5,  $\text{CaCl}_2$  0,08,  $\text{MgCl}_2$  1,8,  $\text{NaHCO}_3$  5,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,5, Na kreatinfosfatas 5, D-gliukozė 5, Na piruvatas 5, HEPES 15 (pH sureguliuotas 1 M NaOH tirpalu iki 7,4), širdis per aortą prijungiama prie Langendorfo perfuzinės sistemos ir 10–15 min. retrogradiškai perfuzuojama 30°C temperatūros bekalciu izoliuojamuoju tirpalu su jaučio kraujo serumo albuminu (JSA) (1 mg/ml) ir 20  $\mu\text{M}$  EGTA (perfuzijos greitis – apie 4 ml/min.). Po to širdis perfuzuojama (10 min.) izoliuojamuoju tirpalu su jungiamąjį audinį ardančiais fermentais: kolagenaze (Yacult S; 500 U/mg aktyvumo) ir tripsinu

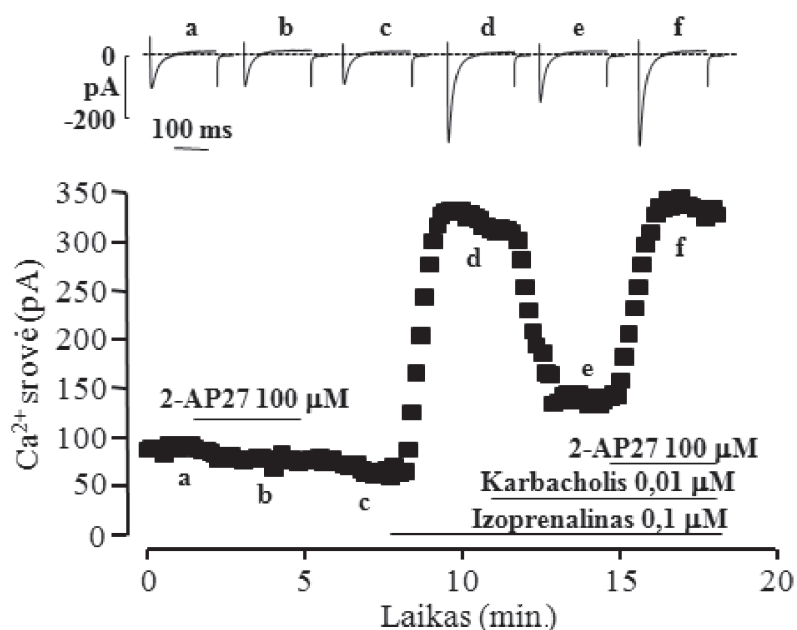
(tipas XIII, Sigma). Visą izoliavimo laiką širdis laikoma termostatuojamoje kameroje (30°C temperatūroje). Po perfuzijos fermentais širdis praplaunama izoliuojamuoju tirpalu (25 ml) su JSA (1 mg/ml) ir perkeliama iš Langendorfo perfuzinės sistemos į indelį su izoliuojamuoju tirpalu, kuriame, švelniai purtant, išskiriami vienetiniai kardiomiocitai.

#### $\text{Ca}^{2+}$ srovės per L-tipo $\text{Ca}^{2+}$ kanalus registravimas

Izoliuotų varlės kardiomiocitų L-tipo  $\text{Ca}^{2+}$  srovė ( $I_{CaL}$ ) registruojama fiksuotos įtampos metodu (angl. *patch-clamp*), perkėlus ląsteles į išorinį fiziologinį tirpalą (mM): NaCl 107,  $\text{MgCl}_2$  1,8,  $\text{CaCl}_2$  1,8, CsCl 20,  $\text{NaHCO}_3$  4,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,8, D-gliukozė 5, natrio piruvatas 5, Hepes 10. Tirpalo pH – 7,4 nustatomas tirpalą titruojant NaOH (1 M). Ląstelę prisiurbiant mikropipetės užpildomos vidiniu tirpalu (mM): CsCl 120,  $\text{MgCl}_2$  4,  $\text{CaCl}_2$  0,062, EGTA 5, Na kreatinfosfatas 5,  $\text{Na}_2\text{ATP}$  3,  $\text{Na}_2\text{GTP}$  0,42, Hepes 10. Tirpalo pH 7,3 nustatomas tirpalą titruojant CsOH (1 M). Registruojant ląstelės  $I_{CaL}$ , visos  $K^+$  jonų srovės nuslopinamos tiek išoriniame, tiek vidiniame tirpaluose  $K^+$  jonus pakeičiant  $\text{Cs}^+$  jonais.  $\text{Na}^+$  kanalų blokavimui varlės kardiomiocituose į išorinį fiziologinį tirpalą dedama 3  $\mu\text{M}$  šių kanalų blokatoriaus tetrodotoksino (TTX). Tirdami 2-aminopiridino darinio 2-AP27 poveikį karbacholio (0,01  $\mu\text{M}$ ) sumažintai  $I_{CaL}$ , naudojome 100  $\mu\text{M}$  jo koncentraciją, t. y. koncentraciją, kuri 50 proc. padidina karbacholio sumažintą miokardo veikimo potencialų trukmę ( $\text{EC}_{50}$ ), nustatytą sulfonilkarbamidinių 2-AP darinių anticholinerginio poveikio tyrimų metu (10).

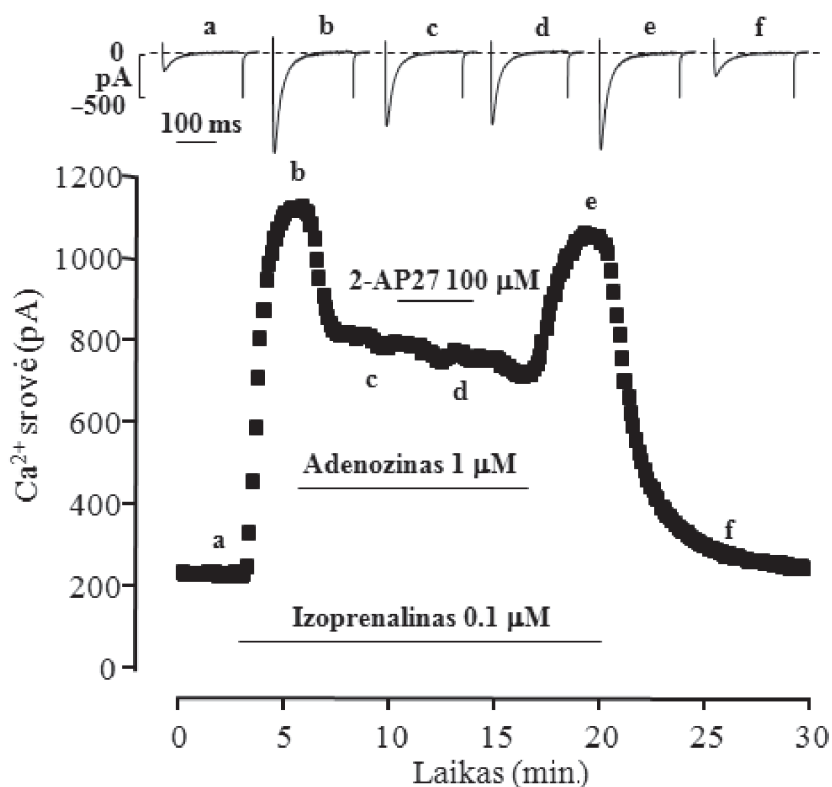
L-tipo  $\text{Ca}^{2+}$  jonų srovei registruoti ir analizuoti naudojamas *patch-clamp* stiprintuvas VP500 (Biologic, Prancūzija) bei programinė įranga (Visual-Patch v1.30, Bio-logic, Prancūzija).  $I_{CaL}$  registruoti ląstelė depoliarizuojama kas 8 sekundes nuo –80 mV palaikomo pastovaus ramybės potencialo iki 0 mV, impulso trukmė – 200 ms.  $I_{CaL}$  amplitudė laikomas skirtumas tarp registruojamos srovės maksimumo ir srovės, registruojamos depoliarizuojamojo impulso 200-ąją ms.

Eksperimentai atliekami tik su tais kardiomiocitais, kuriuose nebuvo matomų formos ar struktūros pokyčių. Tirpalai ties tiriamąja ląstele keičiami automatinio tirpalų keitiklio „RSC-200“ (Bio-logic, Prancūzija) ir pateikiami per 800 mm skersmens kapiliaro angą. Tirpalo tėkmės greitis – 150  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Visi prie ląstelės tiekiami tirpalai nufiltruojami 0,45  $\mu\text{m}$  filtrais. Eksperimentai atliekami kambario temperatūroje (17–22°C), kuri eksperimentų metu nepakinta daugiau nei vienu laipsniu.



**1 pav. Karbacholio ir sulfonilkarbamidinio 2-aminopiridino darinio 2-AP27 įtaka varlės miokardo ląstelės izoprenalinu stimuliuotai L-tipo  $\text{Ca}^{2+}$  srovei**

Junginys 2-AP27 pašalina slopinamąjį karbacholio poveikį izoprenalinu stimuliuotai miokardo ląstelės L-tipo  $\text{Ca}^{2+}$  srovei (paveikslų viršuje – eksperimento metu registruotos L-tipo  $\text{Ca}^{2+}$  srovės kreivės).



**2 pav. Adenozino ir sulfonilkarbamidinio 2-aminopiridino darinio 2-AP27 įtaka varlės miokardo ląstelių izoprenalinu stimuliuotai L-tipo  $\text{Ca}^{2+}$  srovei**

2-AP27 junginys nedidino adenozinu sumažintos L-tipo  $\text{Ca}^{2+}$  srovės, stimuliuotos izoprenalinu (paveikslų viršuje – eksperimento metu registruotos L-tipo  $\text{Ca}^{2+}$  srovės kreivės).

Eksperimentų metu naudojamos mikropipetės gaminamos elektrodų tempikliu (PP-830, Narishige, Japonija) iš stiklo vamzdelių su kapiliaru (Drummond, JAV) ir užpildomos vidiniu tirpalu. Mikropipečių varža – 0,6–1,3 m $\Omega$ .

Eksperimentiniai duomenys analizuojami „Bio-Logic Bio-Patch“ (Patch Clamp Analysis Software – version 3.30) ir „MS Excel 2000“ programine įranga.  $I_{\text{CaL}}$  pokytis išreiškiamas procentais, 10 proc. prilyginus bazinės  $I_{\text{CaL}}$  amplitudę arba izoprenalinu stimuliuotos  $I_{\text{CaL}}$  amplitudę. Tekste pateikiami eksperimentinių duomenų vidurkiai plius/minus vidutinė standartinė paklaida. Rezultatų patikimumas įvertintas Stjudent'o (t) testu. Skirtumai tarp vidurkių statistiškai reikšmingi, kai  $p < 0,05$ .

### Rezultatai

Varlės miokardo ląstelių L-tipo  $\text{Ca}^{2+}$  srovės amplitudė kontrolės sąlygomis, t. y. jas perfuzuojant išoriniu fiziologiniu tirpalu (žr. Tyrimų medžiaga ir metodai), buvo  $183 \pm 33$  pA ( $n=6$ ).  $\beta_1$ - $\beta_2$  – adrenoreceptorių agonistas izoprenalinas (0,1  $\mu\text{M}$ ), įdėtas į šį tirpalą, padidino miokardo ląstelių  $I_{\text{CaL}}$  iki  $475 \pm 61$  proc. ( $n=4$ ) ( $p < 0,05$ ) palyginus su kontrole.  $\text{M}_2$  muskarininių receptorių agonistas karcholis (0,01  $\mu\text{M}$ ) šią srovę sumažino iki  $42 \pm 15$  proc. palyginus su izoprenalinu stimuliuotos  $I_{\text{CaL}}$  dydžiu. 2-AP27 junginys (100  $\mu\text{M}$ ), kuris neturėjo poveikio varlės miokardo ląstelių kontrolei, izoprenalinu nestimuliuotai  $I_{\text{CaL}}$  ( $98 \pm 3,1$  proc. palyginus su kontrole,  $n=3$ ), karcholio sumažintą izoprenalinu stimuliuotą  $I_{\text{CaL}}$  padidino iki  $95 \pm 5,8$  proc. ( $n=4$ ) ( $p < 0,05$ ), t. y. panaikino slopinamąjį karcholio poveikį. Junginio 2-AP27 (100  $\mu\text{M}$ ) poveikis kontrolei  $I_{\text{CaL}}$  ir karcholio sumažintai (0,01  $\mu\text{M}$ ) izoprenalino stimuliuotai (0,1  $\mu\text{M}$ )  $I_{\text{CaL}}$  pavaizduotas 1 pav.

Analogiški eksperimentai atlikti, tiriant 2-AP27 junginio įtaką varlės miokardo ląstelių izoprenalinu stimuliuotai  $I_{\text{CaL}}$ , ją slopinant per kitus su  $\text{G}_i$  susijusius receptorių – adenosino  $\text{A}_1$  receptorių. 2 paveiksle parodytas eksperimento metu užregistruotas  $I_{\text{CaL}}$  kitimas, veikiant izoprenaliniui (0,1  $\mu\text{M}$ ), adozinui (1  $\mu\text{M}$ ) ir 2-AP27 (100  $\mu\text{M}$ ) junginiui. Šioje eksperimentų serijoje izoprenalinas (0,1  $\mu\text{M}$ ) padidino  $I_{\text{CaL}}$  iki  $638 \pm 168$  proc., o adozinas (1  $\mu\text{M}$ ) šią srovę sumažino iki  $56 \pm 10$  proc. ( $n=3$ ) ( $p < 0,05$ ) palyginus su izoprenalinu stimuliuotos  $I_{\text{CaL}}$  dydžiu. Veikiant 2-AP27 (100  $\mu\text{M}$ ) junginiui, adenosino sumažinta  $I_{\text{CaL}}$  išliko beveik nepakitusi ir buvo  $51 \pm 7,9$  proc. ( $n=3$ ) ( $p < 0,05$ ) palyginus su izoprenalinu stimuliuota  $I_{\text{CaL}}$ .

Taigi, eksperimentiniai tyrimai parodė, kad karcholis

ir adozinas, sąveikaudami su skirtingais membranos receptoriais (muskarino  $\text{M}_2$  ir adenosino  $\text{A}_1$ ), mažina izoprenalinu stimuliuotą varlės miokardo ląstelių  $I_{\text{CaL}}$ . Tačiau 2-AP27 junginio poveikis šių receptorių agonistų sumažintai varlės miokardo ląstelių izoprenalinu stimuliuotai L-tipo  $\text{Ca}^{2+}$  srovei yra skirtingas – muskarino  $\text{M}_2$  receptorių agonisto karcholio slopinamąjį poveikį 2-AP27 junginys panaikino, tačiau neturėjo įtakos adenosino  $\text{A}_1$  receptorių agonisto adenosino sukeltam  $I_{\text{CaL}}$  sumažėjimui.

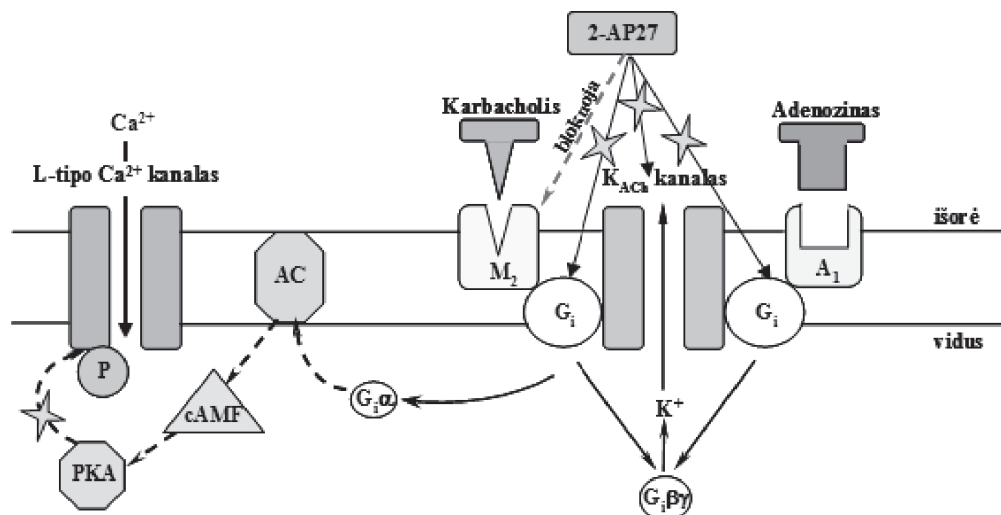
### Rezultatų aptarimas

Jonų srovių registravimo fiksuotos įtampos (angl. *patch-clamp*) metodu ištirtas 2-aminopiridino naujo sulfonilkarbamidinio darinio 2-AP27, pasižyminčio veiksmingu anticholinerginiu poveikiu jūrų kiaulytės miokardo veikimo potencialų trukmei, susitraukimo jėgai ir sinusiniam širdies ritmui (10), poveikis varlės miokardo ląstelių izoprenalinu aktyvintai L-tipo  $\text{Ca}^{2+}$  srovei. Šie tyrimai atlikti siekiant nustatyti šio junginio anticholinerginio poveikio mechanizmą, t. y. ar 2-AP27 junginys tiesiogiai blokuoja muskarino  $\text{M}_2$  receptorių, ar blokuoja  $\text{K}_{\text{Ach}}$  kanalus, ar slopina  $\text{G}_i$  baltymų aktyvumą. Šio sulfonilkarbamidinio junginio poveikis miokardo ląstelių izoprenalinu stimuliuotai  $I_{\text{CaL}}$  buvo tirtas karcholiu aktyvintų muskarino  $\text{M}_2$  ir adozinu aktyvintų adenosino  $\text{A}_1$  receptorių sąlygomis. Nors karcholis ir adozinas aktyvina skirtingus ląstelės membranos receptorių, tačiau jų poveikis pasireiškia per suaktyvėjusį  $\text{G}_i$  baltymą, kurio  $\text{G}_i\beta\gamma$  dimeras jungiasi prie  $\text{K}_{\text{Ach}}$  kanalų ir juos aktyvina, o  $\text{G}_i\alpha$  subvienetas slopina adenililciklazės aktyvumą, cAMF susidarymą, L-tipo  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų fosforilinimą ir  $\text{Ca}^{2+}$  jonų srovę per šiuos kanalus (1, 2, 13, 14).

Sulfonilkarbamidinis 2-aminopiridino darinys 2-AP27 (2-aminopiridino darinys su 4-toluolsulfonilkarbamido fragmentu vietoje amino grupės ir piridino azotu, kvaternizuotu 4-nitrobenzilo bromidu) panaikino karcholio sukeltą izoprenalinu aktyvintos  $I_{\text{CaL}}$  sumažėjimą, tačiau neturėjo įtakos adozinu sumažintai  $I_{\text{CaL}}$ . Remiantis šiais duomenimis, galima teigti, kad junginys 2-AP27 blokuoja miokardo ląstelių muskarino  $\text{M}_2$  receptorių, todėl neaktyvinami kokliušo toksinui jautrūs  $\text{G}_i$  baltymai ir nuo jų poveikio priklausoma izoprenalinu stimuliuota miokardo ląstelių L-tipo  $\text{Ca}^{2+}$  srovė nesumažėja (junginio 2-AP27 poveikio mechanizmas parodytas 3 pav.)

### Išvados

1. Muskarino  $\text{M}_2$  receptorių agonistas karcholis ir adenosino receptorių agonistas adozinas suma-



### 3 pav. Karbacholio, adenosino ir sulfonilkarbamidinio 2-aminopiridino darinio 2-AP27 veikimo mechanizmo miokardo ląstelėse schema

Karbacholis –  $M_2$  receptorių agonistas, arba adenosinas –  $A_1$  receptorių agonistas aktyvuoja miokardo ląstelių  $G_i$  baltymus. Šių baltymų  $G_{i\beta}$  subvienetai aktyvuoja  $K_{ACH}$  kanalus ir didina  $K^+$  jonų srovę ( $I_{KACH}$ ), o  $G_{i\alpha}$  subvienetai slopina adenilatciklazės (AC) aktyvumą, cAMP susidarymą, baltymų kinazės A (PKA) aktyvumą, L-tipo kanalų fosforilinimą ir  $Ca^{2+}$  jonų srovę ( $I_{CaL}$ ). 2-AP27 junginys, blokuodamas muskarino  $M_2$  receptorių, panaikina slopinamąjį karbacholio poveikį izoprenalinu stimuliuotai  $I_{CaL}$ .  $A_1$  receptorių agonisto adenosino sumažintai  $I_{CaL}$  junginys 2-AP27 įtakos neturėjo.

$M_2$  – muskarino receptorių,  $A_1$  – adenosino receptorių (modifikuota remiantis (5, 8, 13)).

žino varlės miokardo ląstelių L-tipo  $Ca^{2+}$  srovę.

2. 2-aminopiridino darinys 2-[(4-metilfenil)sulfonilkarbamido]-1-(4-nitrobenzil)piridino bromidas (2-AP27) panaikina slopinamąjį karbacholio poveikį

miokardo ląstelių L-tipo  $Ca^{2+}$  srovei, tačiau neturėjo įtakos adenosino sumažintai L-tipo  $Ca^{2+}$  srovei. Tai rodo, kad 2-AP27 junginys tiesiogiai blokuoja miokardo ląstelių muskarino  $M_2$  receptorių.

### $I_{KACH}$ inhibitor 2-[(4-methylphenyl)sulfonylcarbamido]-1-(4-nitrobenzyl)pyridinium bromide (2-AP27) is a muscarinic $M_2$ receptor antagonist

Vytenis Arvydas Skeberdis, Vida Gendvilienė, Danguolė Zablockaitė,  
Irma Martišienė, Antanas Stankevičius

Institute of Cardiology, Kaunas University of Medicine, Lithuania

**Key words:** myocardial cells; carbachol; adenosine; sulfonylcarbamide derivative of 2-aminopyridine; 2-AP27; L-type  $Ca^{2+}$  current.

**Summary.** Aminopyridines are known to inhibit acetylcholine-activated  $K^+$  current ( $I_{KACH}$ ) in cardiac myocytes. The aim of this study was to examine the effect of 2-aminopyridine sulfonylcarbamide derivative 2-AP27 on isoprenaline-stimulated L-type  $Ca^{2+}$  current ( $I_{CaL}$ ) and to identify whether 2-AP27 acts via blocking of muscarinic  $M_2$ -receptors in frog cardiomyocytes.

The whole-cell configuration of the patch-clamp technique was used to record  $I_{CaL}$  in enzymatically isolated cardiac myocytes. Isoprenaline (0.1  $\mu M$ ), an agonist of  $\beta_1$ - $\beta_2$ -adrenoreceptors, stimulated the  $I_{CaL}$  up to  $475 \pm 61\%$  ( $n=4$ ) ( $P<0.05$ ) vs. control. Then, in the first series of experiments, carbachol (0.01  $\mu M$ ), an agonist of  $M_2$  muscarinic receptors, reduced the stimulatory effect of isoprenaline to  $42 \pm 15\%$  vs. isoprenaline alone. 2-AP27 (100  $\mu M$ ) alone completely abolished the inhibitory effect of carbachol on isoprenaline-stimulated  $I_{CaL}$ , which recovered to  $95 \pm 5.8\%$  of the effect of isoprenaline. In the second series of experiments, adenosine

(1  $\mu$ M), an agonist of  $A_1$ -adenosine receptors, reduced the stimulatory effect of isoprenaline on  $I_{CaL}$  to  $56 \pm 10\%$  ( $n=3$ ) ( $P<0.05$ ). Then 2-AP27 (100  $\mu$ M) applied in the presence of adenosine, had no effect on  $I_{CaL}$ , which remained at  $51 \pm 7.9\%$  ( $n=3$ ) ( $P<0.05$ ) of the effect of isoprenaline. These results suggest that 2-AP27, a new derivative of 2-AP, containing 4-toluolsulfonylcarbamide instead of amino group and quaternized nitrogen by 4-nitrobenzylbromide in pyridine ring, is acting as an antagonist of muscarinic  $M_2$  receptors in frog ventricular myocytes.

Correspondence to V. Gendvilienė, Institute of Cardiology, Kaunas University of Medicine, Sukilėlių 17, 50161 Kaunas. E-mail: membriof@kmu.lt

## Literatūra

1. Harvey RD, Belevych AE. Muscarinic regulation of cardiac ion channels. *Br J Pharmacol* 2003;139:1074-84.
2. Kovoor P, Wickman K, Maguire CT, Pu W, Germann J, Berul ChI, et al. Evaluation of the role of  $K_{Ach}$  in atrial fibrillation using a mouse knockout model. *J Am Coll Cardiol* 2001;37(8):2136-43.
3. Liu L, Nattel S. Differing sympathetic and vagal effects on atrial fibrillation in dogs: role of refractoriness heterogeneity. *Am J Physiol* 1997;273:H805-16.
4. Iost N, Virag L, Varro A, Papp JG. Comparison of the effect of class IA antiarrhythmic drugs on transmembrane potassium currents in rabbit ventricular myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2003;8(1):31-41.
5. Mori K, Hara Y, Saito T, Masuda Y, Nakaya H. Anticholinergic effects of class III antiarrhythmic drugs in guinea pig atrial cells. Different molecular mechanisms. *Circulation* 1995;91(11):2834-43.
6. Brooks RR, Drexler AP, Maynard AE, Al-Khalidi H, Kostreva DR. Proarrhythmia of azimilide and other class III antiarrhythmic agents in the adrenergically stimulated rabbit. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000;223(2):183-9.
7. Pogwizd SM, Bers DM. Cellular basis of triggered arrhythmias in heart failure. *Trends Cardiovasc Med* 2004;14:61-6.
8. Tamargo J, Caballero R, Gomez R, Valenzuela C, Delpon E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 2004;62:9-33.
9. Johnson NC, Morgan MW. An unusual case of 4-aminopyridine toxicity. *J Emerg Med* 2006;30(2):175-7.
10. Gendvilienė V, Zablockaitė D, Martišienė I, Gurskaitė H, Stankevičius A. Anticholinergic effect of 2-aminopyridine and its sulfonylcarbamide derivatives on electromechanical activity in guinea pig atrium. *Medicina (Kaunas)* 2007;43(10):808-15.
11. Ito H, Hosoya Y, Inanobe A, Tomoike H, Endoh M. Acetylcholine and adenosine activate the G protein-gated muscarinic  $K^+$  channel in ferret ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1995;351:610-7.
12. Kurachi Y, Tung R, Ito H, Nakajima T. G protein activation of cardiac muscarinic potassium channel. *Prog Neurobiol* 1992;39:226-46.
13. Lomax AE, Rose RA, Wayne RG. Electrophysiological evidence for a gradient of G protein-gated  $K^+$  current in adult mouse atrial. *Br J Pharmacol* 2003;140:576-84.
14. Tamargo J, Caballero R, Gomez R, Valenzuela C, Delpon E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 2004;62:9-33.

*Straipsnis gautas 2008 07 01, priimtas 2009 07 03*

*Received 1 July 2008, accepted 3 July 2009*