

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**¹¹C-IZOTÓPPAL JELZETT KOFFEINSZÁRMAZÉKOK
RADIO SZINTÉZISE A SZÖVETI ADENOZINRECEPTOR
ELOSZLÁS PET-VIZSGÁLATÁHOZ**

BOROS ISTVÁN



DEBRECENI EGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
DEBRECEN, 2002.

Bevezetés

A sejtek külső membránfelszínén található purinerg receptorokat attól függően, hogy adenin-nukleozidra (adenozin) vagy nukleotidra (ATP) érzékenyek, a P₁, illetve a P₂ csoportba sorolták. Ismeretes, hogy a P₁-típusú adenzinreceptorok különböző szöveti sejtek membránján expresszálódnak és a központi idegrendszer és a perifériás szövetek működésének szabályozásában egyaránt kiemelkedő fontosságúak.

Az adenzinnak meghatározó szerepe van a koszorúerek keringés szabályozásában, valamint az endogén kardioprotekcióban. Ez magában foglalja a prekondicionáló, anti-iszkémiás, antiarritmiás hatásokat, valamint az energiaellátást és mikrovaszkularizációt elősegítő effektusokat is. Számos megfigyelés támasztja alá, hogy a krónikus metilxantin (koffein) kezelés a centrális és perifériális adenzinreceptorok túlszabályozásához vezet (up regulation). Azt is kimutatták, hogy bizonyos sejteken az adenzin analógokkal történő tartós expozíció az adenzinreceptorok deszenzibilizációját eredményezi (down regulation). Statisztikai adatok bizonyítják, hogy a benzodiazepin készítmények tartós szedése a fatális kimenetelű myocardialis infarktusok kialakulásának gyakoriságát ötszörösére növeli. Hosszú időn át fenntartott magas koffein dózisok ugyancsak növelik az infarktusok kockázatát. Mindezek a kísérleti tapasztalatok arra engednek következtetni, hogy a pszichotróp szerekekkel, benzodiazepin, metilxantin készítményekkel végzett tartós terápia alapvetően módosíthatja a purinerg receptormechanizmusokat. Felvetődik a kérdés, hogy magyarázhatják-e az előzőekben részletezett megfigyeléseket az adenzinreceptor expresszióban bekövetkező változások? Az ilyen hatások tanulmányozásához kitűnő segédletet biztosíthat egy PET-izotóppal jelzett receptor ligandum.

A P₁-típusú adenzinreceptoroknak jelenleg 4 altípusa ismert. Valamennyi adenzinreceptor effektor mechanizmusa G-fehérjéken keresztül valósul meg. Az

A₁-receptorok számos hatást közvetítenek, agonistákkal való kölcsönhatásuk, telítésük gátolja az adenilciklázt, valamint a cAMP termelést, fokozza a membrán K⁺ konduktanciáját, a Ca²⁺ felszabadulást. Az A_{2A} és A_{2B} receptorok egyik közös sajátossága, hogy kölcsönhatásuk, telítésük az adenilcikláz aktivitását fokozza, amely a cAMP termelés növekedéséhez vezet. Az A₃ receptorhatás hasonló az A₁-hez. A NECA ismert A₁, A₂ és A₃ agonista, a CSC pedig specifikus A_{2A} antagonistája.

A pozitronemissziós tomográfia (PET) a szöveti biokémia tanulmányozását lehetővé tevő képalkotó eljárás. A módszer alkalmazása során pozitronbomló izotóppal megjelölt, biológiailag aktív vegyületet (radiofarmakon) juttatnak a vizsgálatban résztvevő személybe vagy más élő rendszerbe. A PET-kamerával meghatározható a radiofarmakonok háromdimenziós eloszlása, amely képszerű formában karakterizálja az egyes szervek, szövetek kvantitatív biokémiai paramétereit, például a glukóz anyagcsere, az aminosav transzport, a fehérjeszintézis, a sejtosztódás, a szöveti oxigénfelhasználás vagy a (neuro-, illetve egyéb) receptorstátusz jellemzőit.

A specifikus adenzinreceptor kötőhelyek feltérképezésében jelenleg a PET az egyik legígéretesebb és világviszonylatban is a legkifinomultabb technika. A PET rendkívül nagy érzékenysége lehetővé teszi az egyes biológiai struktúrák olyan alacsony koncentrációban (pmol) történő vizsgálatát, amely más képalkotó eljárások számára a detektálási küszöb alatt marad.

Célkitűzések

A kutatási téma keretében pozitront emittáló izotóppal jelzett, nagy specifikus aktivitású adozinreceptor ligandumok szerves preparatív és radiokémiai szintézisének megvalósítása volt a feladatunk, biztosítva azt, hogy a radiofarmakonok előállítása automatizált technológiával történjen. A program összetevői:

1. P₁ xantin típusú adozinreceptor antagonisták előállítása és ¹¹C-PET-izotóppal történő jelölése;
2. a radiofarmakon előállítás automatizálása;
3. a szintetizált jelzetlen és jelzett receptor ligandumok kémiai minőségvizsgálata;
4. nagy specifikus aktivitású, ¹¹C-jelzett klórsztirilkoffein ([¹¹C]CSC) előállítása, automatizált szintézise és minőségellenőrzése;
5. A_{2A}-adozinreceptor szelektivitás farmakológiai elemzése.

A kutatási téma keretében további feladatunk volt a [¹¹C]CSC antagonistá és az adozinreceptor kötődésének előzetes vizsgálata különféle biológiai rendszerekben. E kutatási feladat keretein belül:

1. a receptor-ligandum kötődés specifikusságának *in vivo* és *in vitro* vizsgálata;
2. a receptor-ligandum kötődés szervezeten belüli eloszlásának *in vivo* és *ex vivo* tanulmányozása;
3. a [¹¹C]CSC ligandum-receptor kötődéskinetika vizsgálata pozitron emissziós tomográfiával nyúlban;
4. a kötődési kinetikát leíró paraméterek meghatározása.

Anyagok és módszerek

Inaktív szintézis

Az inaktív 7-metil-sztirilxantin-vegyületeket, azaz a (*E*)-8-sztiril-1,3,7-trimetilxantint (SC); (*E*)-8-(3-klórosztiril)-1,3,7-trimetilxantint (CSC); (*E*)-8-(3-jódsztiril)-1,3,7-trimetilxantint (ISC); (*E*)-8-(3-nitrosztiril)-1,3,7-trimetilxantint (NSC); (*E*)-8-(3,4-dimetoxisztiril)-1,3,7-trimetilxantint (3,4-DMSC); (*E*)-8-(3,5-dimetoxisztiril)-1,3,7-trimetilxantint (3,5-DMSC); (*E*)-8-(3,4,5-trimetoxisztiril)-1,3,7-trimetilxantint (TMSC); (*E*)-8-(3,4-dimetoxisztiril)-1,3-dipropil-7-metilxantint (3,4-DMDPrSC); (*E*)-8-(3,5-dimetoxisztiril)-1,3-dipropil-7-metilxantint (3,5-DMPPrSC) valamint a megfelelő prekursor molekulákat: (*E*)-8-sztiril-1,3-dimetilxantint (SX); (*E*)-8-(3-klórsztiril)-1,3-dimetilxantint (CSX); (*E*)-8-(3-jódsztiril)-1,3-dimetilxantint (ISX); (*E*)-8-(3-nitrosztiril)-1,3-dimetilxantint (NSX); (*E*)-8-(3,4-dimetoxisztiril)-1,3-dimetilxantint (3,4-DMSX); (*E*)-8-(3,5-dimetoxisztiril)-1,3-dimetilxantint (3,5-DMSX); (*E*)-8-(3,4,5-trimetoxisztiril)-1,3-dimetilxantint (TMSX); (*E*)-8-(3,4-dimetoxisztiril)-1,3-dipropilxantint (3,4-DMDPrSX); (*E*)-8-(3,5-dimetoxisztiril)-1,3-dipropilxantint (3,5-DMPPrSX) az irodalomból ismert módszerekkel állítottuk elő [Jacobson K. A., 1993]. Az új jódsztiril koffein előállításához alkalmazott 3-jódfahéjsavat az irodalomban ismert eljárással, m-nitrofahéjsavból állítottuk elő [Patterson T. S., 1896]. Az előállított vegyületek szerkezetét NMR- és MS-vizsgálatokkal igazoltuk és a tisztaságukat olvadáspont mérésekkel, HPLC- és TLC-eljárásokkal ellenőriztük.

Az új ISX és ISC ¹H-NMR adatai

Vegyület	¹ H-NMR adatok
ISX	3,25 (s, 3 H, N ₃ -CH ₃), 3,48 (s, 3 H, N ₁ -CH ₃), 7,05 (d, 1 H, J=16 Hz), 7,2 (t, 1 H, J=6 Hz), 7,55 (d, 1 H, J=16 Hz), 7,60-7,88 (m, 2 H), 8,00 (s, 1H) 13,64 (s, 1 H, N ₇ -H).
ISC	3,22 (s, 3 H, N ₃ -CH ₃), 3,48 (s, 3 H, N ₁ -CH ₃), 4,04 (s, 3 H, N ₇ -CH ₃), 7,14-7,32 (m, 1 H) 7,41 (d, 1 H, J=16 Hz), 7,56 (d, 1 H, J=16 Hz), 7,72 (t, 2 H, J=6 Hz), 8,26 (s, 1H) 13,64 (s, 1 H, N ₇ -H)

Radiokémiai szintézisek

$[^{11}\text{C}]$ Metiljodid

A $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ -dot a Debreceni Atommagkutató Intézet MGC 20E ciklotronjában, a $^{14}\text{N}(\text{p},\alpha)^{11}\text{C}$ ($^{11}\text{C} + \text{O}_2 \rightarrow ^{11}\text{CO}_2$) magreakcióval, 14,5 MeV energiájú protonnyalábbal és $1,3 \times 10^6$ Pa nyomású targetgázból állítottuk elő (hozam 1,6-2,2 GBq/mA). A kapott $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ -ot automatizált panelen, LiAlH_4 -gyel, $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OH}$ -lá redukáljuk, amit HI-dal reagáltatva $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ képződik. Az így előállított $[^{11}\text{C}]$ metiljodidot metilezési reakcióban használjuk tovább.

$[^{11}\text{C}]$ Metilezés

Az *E-Z* izomerizáció elkerülésére a műveleteket fénymentes körülmények között végeztük el. A xantin-prekuzort DMF-ben (1 mg / 0,4-1 ml) oldottuk. Az oldatot 10 mg kálium-karbonát jelenlétében, 10 percen át 70°C hőmérsékleten $[^{11}\text{C}]$ metileztük a fenti automatizált radiokémiai panelben. A szintézis végén a reakcióelegyet 25 μl , 4 mol/l-es sósavoldattal semlegesítettük, majd a terméket analitikai HPLC-rendszerrel (LiChrosphere RP 18 (250-4) oszlop, vizes acetonitril különböző összetételű elegyeit használva futtatószerként, 1 ml/min áramlási sebességgel) vizsgáltuk. Az inaktív vegyületek spektrumait 290 nm-re beállított UV-detektorral határoztuk meg. A radioaktív vegyület R_t -értékét, az UV-detektorral sorba kötött radioaktivitás detektoron, az előzőekben meghatározott inaktív anyagok R_t -értékeinek segítségével azonosítottuk.

Farmakológia jellemzés

A DE Gyógyszertani Intézettel közös együttműködés keretében, Dr. Szentmiklósi József tanár Úr irányításával farmakológiai vizsgálatokat végeztünk a CSC-vel, 3,5-DMSC-vel, 3,4,5-TMSC-vel, valamint az új ISC-vel. Referenciavegyületként a jelenleg leghatékonyabb A_{2A} -receptor blokkoló, ZM 241385 jelzésű vegyületet

használtuk, amely nem xantinszármazék. A vizsgálatokat patkány pulmonális artéria (A_{2A} -receptorokat hordozó szövet), tengerimalac pulmonális artéria (A_1 - és A_{2B} -receptorokat hordozó szövet), valamint tengerimalac pitvari myocardium (A_1 típusú adozinreceptorokat hordozó szövet) preparátumokon végeztük el. A vegyületeket Schild-féle regressziós analízissel kapott pA_2 -értékeikkel jellemeztük.

A [^{11}C]CSC biológiai vizsgálata

[^{11}C]CSC specifikus kötődése DDT1 MF2 sejtvonalon:

Előpreparált DDT1 MF2 simaizom transzformált sejtvonalat (1 millió/l) 20 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{11}C]CSC jelenlétében 20 percig 37°C-on inkubáltuk. A kompetíciós vizsgálatokra a sejtvonalakat 10 percig előinkubáltuk inaktív CSC-vel vagy ZM 241385 (ismert antagonistá). Ezt követően a sejteket sejtszeparálón (SKATRON Cell Harvester, 11019) elválasztottuk, és a [^{11}C]CSC akkumulációját hitelesített gammaszámlálóval mértük (Canberra-Packard). A radioaktivitás-koncentrációt cps (count/second) egységekben adtuk meg 1 millió sejtre vonatkoztatva.

Autoradiográfias (ARG) vizsgálat

Az autoradiográfias (ARG) vizsgálatokhoz az agy- és szívszeletek radioaktivitás-eloszlásának térképét PhosphorImager scannerrel (Molecular Dynamics) értékeltük ki. Az anatómiai lokalizálására a metszett szeletekről transzparencia scanner képeket (HP ScanJet 4c/T) is készítettünk.

A jelzett ligandum szervezeten belüli megoszlásának vizsgálata

A [^{11}C]CSC szervezeten belüli megoszlását Swiss-egereken vizsgáltuk. Az elaltatott állatokba 120-200 $\mu\text{Ci/}$ 1,2-8 nmol (4,44-7,4 MBq) mennyiségű jelzett [^{11}C]CSC-radioligandumot injektáltunk intravénásan. Ezt követően az állatokat 10, 20, 40 és 60 perc inkubációs idő eltelté után leöltük, és az egyes szervek

radioaktivitását gammaszámlálóval megmértük. A szervek nCi/g-ban kifejezett ligand akkumuláció mértékét a beadott aktivitásra és az állat tömegére normáltuk.

Dinamikus PET-vizsgálat

A PET-vizsgálatokhoz az elaltatott nyulaknak 1-2 mCi/30-60 nmol [¹¹C]CSC-farmakont injektáltunk intravénásan. A dinamikus PET-felvételeket GE 4096 típusú, egésztest PET-kamerával készítettük. Az állatot úgy helyeztük a PET kamera látómezejébe, hogy az állat testének tengelye párhuzamos volt a detektorgyűrű síkjával. Így 15 db szagittális szeletet készítettünk, a kapott kép nagyjából magában foglalta a nyúl egész testtömegét. Az egyes szervek pontosabb meghatározása érdekében a nyúlról [¹⁸F]FDG PET-felvételt is készítettünk.

A dinamikus PET vizsgálatok során a radiofarmakon beadását követő pillanattól monitoroztuk a receptor-ligandum szöveti felhalmozódását az egész állatban. A szöveti eloszlás dinamikáját egy 40 perces időskálán vizsgáltuk. Az egymást követő expozíciókból meghatároztuk a ligandum akkumulációs kinetikáját a különböző specifikus régiókban. A vizsgálat egész időtartama alatt meghatározott időközönként artériás vérmintákat vettünk az állatokból és meghatároztuk a vérben lévő ligandumkoncentráció időbeli változását.

Négykompartmentes farmakokinetikai modell

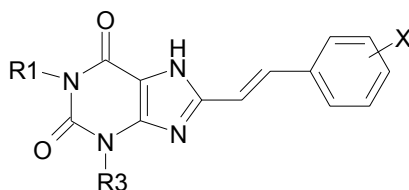
A receptor-ligandumok szervezeten belüli egyensúlyi megoszlásának tanulmányozására alkalmazott legáltalánosabb modell a négykompartmentes modell [Landaw E: M, 1984]. A kompartment analízis során nyúlagyban, dinamikus PET vizsgálattal meghatározott időfüggő véraktivitás görbét, valamint az agy szöveti görbét használtuk fel. A kinetikai és egyéb állandók numerikus értékének számítása egy speciális iteratív, nem-lineáris regresszió-számítás alapján történt.

Eredmények

Prekurzorok és inaktív ligandumok

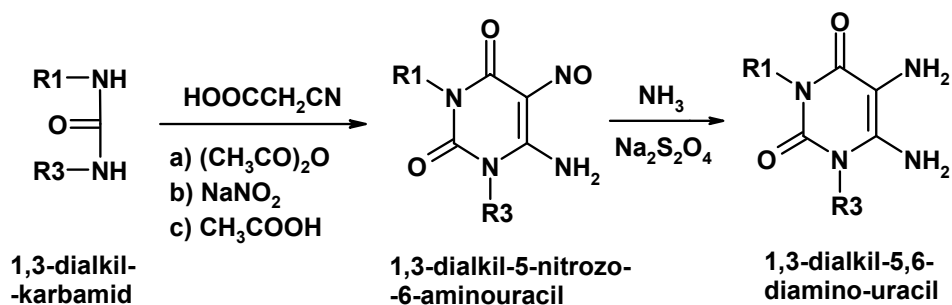
A kísérleteinkhez kiválasztott tíz, P1 típusú, antagonistá hatású sztirilxantinszármazékot az irodalomban ismert eljárásokkal állítottuk elő.

Az előállított prekurzorok



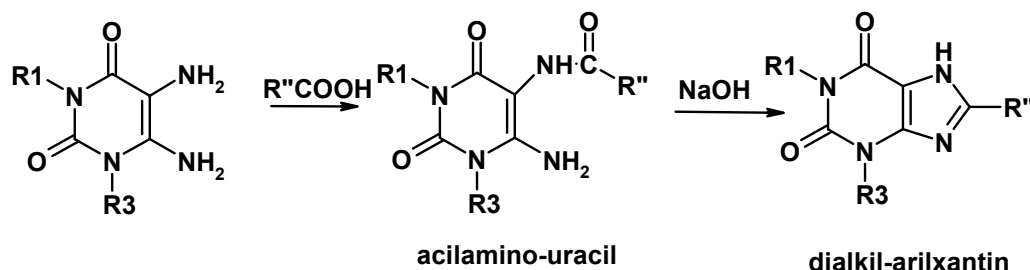
Prekurzor	R ₁ ,R ₃	X	Prekurzor	R ₁ ,R ₃	X
SC	Me	H	3,5-DMSX	Me	3,5-(MeO) ₂
CSX	Me	3-Cl	3,4,5-TMSX	Me	3,4,5-(MeO) ₃
ISX	Me	3-I	NDPrSX	Pr	3-NO ₂
NSX	Me	3-NO ₂	3,4-DMDPrSX	Pr	3,4-(MeO) ₂
3,4-DMSX	Me	3,4-(MeO) ₂	3,5-DMDPrSX	Pr	3,5-(MeO) ₂

A szintézis első lépésében a kiindulási karbamidszármazékot ciánecetsavval kondenzáltuk, a köztiterméket alkálikus közegben ciklizáltuk, NaNO₂ alkalmazásával nitrozáltuk, majd a nitrozocsoportot redukáltuk, így előállítottuk az 1,3-dialkil-5,6-diamino-uracil vázat.



Traube szintézis reakcióvázlata.

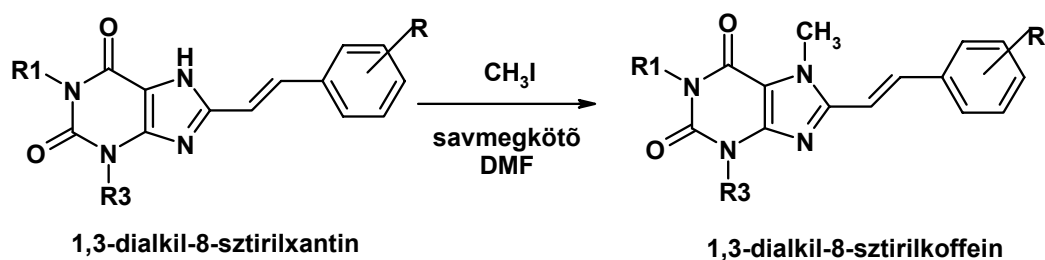
Ezután a kapott uracilszármazékot különböző transz-fahéjsavakkal acileztük, majd a kapott amidouracilt bázikus körülmények között ciklizáltuk, így előállítottuk a megfelelő prekuzormolekulákat.



A prekuzor szintézis reakcióvázlata

Az általunk szintetizált új ISX előállításához alkalmazott 3-jód-fahéjsavat az irodalomban ismert eljárással, m-nitrofahéjsav redukálásával, majd a kapott aminofahéjsav diazotálásával és jódozásával állítottuk elő. A kapott jódfahéjsavat a fenti módszer szerint 5,6-diamino-uracillal reagáltattuk.

Ezután a kapott prekuzormolekulák metilezésével előállítottuk a megfelelő, inaktív 7-metil-sztirilxantin-származékokat.



Reakcióvázlat a metilezéshez

Az előállított vegyületek szerkezetét olvadáspontmérésekkel, NMR- és MS-vizsgálatokkal igazoltuk. Ezután meghatároztuk a vegyületek DMSO-oldhatóságát, amely adatok a biológiai vizsgálatokhoz szükségesek.

TLC-vizsgálatok alapján kidolgoztuk a vegyületek azonosítására alkalmas, analitikai HPLC, valamint az elválasztásukat lehetővé tevő megfelelő preparatív HPLC-eljárásokat. A csúcsokat 290 nm hullámhosszra beállított UV-detektorral azonosítottuk. Futtatószerként különböző összetételű, víz-acetonitril elegyet használtunk, melynek áramlási sebessége 1 ml/min volt.

Az előállított vegyületek HPLC-retenciósi ideje

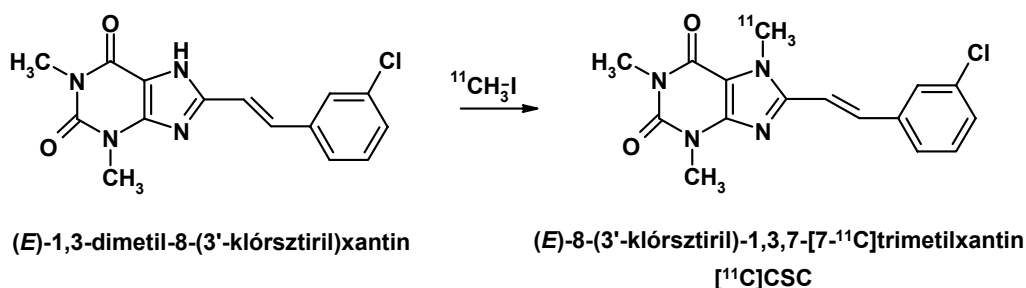
Vegyület	MeCN:H ₂ O [%]	Rt. [perc]	Vegyület	MeCN:H ₂ O [%]	Rt. [perc]
SX	6:4	3,71	SC	6:4	5,55
CSX	7:3	3,45	CSC	7:3	5,43
ISX	7:3	4,77	ISC	7:3	7,6
NSX	7:3	5,12	NSC	7:3	8,84
3,4-DMSX	6:4	3,03	3,4-DMSC	6:4	4,45
3,5-DMSX	1:1	5,48	3,5-DMSC	1:1	10,17
TMSX	1:1	3,98	TMSC	1:1	6,35
NSPrX	1:1	5,83	NSPrC	1:1	9,98
3,4-DMDPrSX	6:4	6,77	3,4-DMDPrSC	6:4	13,28
3,5-DMDPrSX	1:1	5,65	3,5-DMDPrSC	1:1	10,20

A kapott adatok alapján dolgoztuk ki a radioaktív termék elválasztására alkalmazott preparatív HPLC-módszert.

Radiokémia szintézis

[¹¹C]CSC előállítása

A 8-(3-klórsztiril)-1,3,7-[7-¹¹C]trimetil koffein ([¹¹C]CSC) radiokémiai szintézise a CSX [¹¹C]metiljoddal való metilezésével történik. A pontos reakciókörülményeket, reakcióhozamokat a táblázatban mutatjuk be.



Reakcióvázlat a [¹¹C]CSC radiokémiai szintéziséhez

[¹¹C]CSC radiokémiai szintézisének optimalizálása (savmegkötő kiválasztása)

mg prekursor / ml DMF	Katalizátor	Rk. Hőm (°C)	Rk. idő (perc)	Hozam* (%)
1/0,4	5 mg K ₂ CO ₃	60	10	19,9
1/0,4	8 mg K ₂ CO ₃	60	10	33,6-40,2
1/0,4	10 mg K ₂ CO ₃	60	10	39,9-47,3
1/0,4	10 mg K ₂ CO ₃	60	12	32,9
1/0,4	14 mg K ₂ CO ₃	60	10	21,6
1/0,4	10 mg Cs ₂ CO ₃	60	10	20,3-24,3
1/0,4	10 ml NaOH (5M)	60	10	8

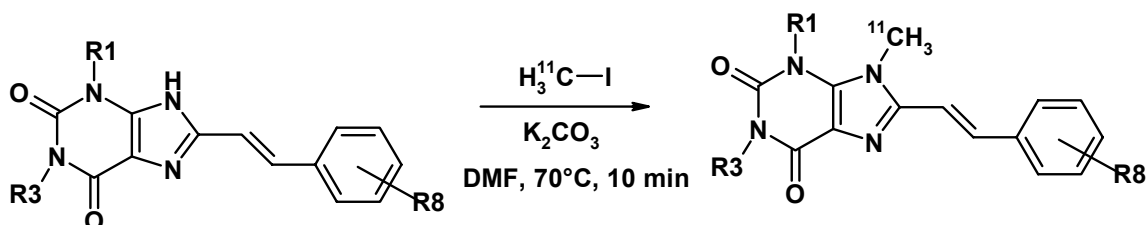
* radiokémiai szintézis végére korrigálva, a kiindulási [¹¹C]CO₂-re számolva

A reakció kálium- vagy cézium-karbonát jelenlétében jó hozammal megy végbe. A legjobb hozam 0,4 ml DMF-ben, 10 mg kálium-karbonát jelenlétében, 60°C-on és 10 perc alatt érhető el. Az anyagot preparatív HPLC-rendszerben elválasztottuk a szennyezésektől, majd előkészítettük a [¹¹C]CSC-t tartalmazó frakciót a farmakológiai vizsgálatokra. A késztermékből mintát vettünk az analitikai HPLC-vizsgálatra.

A kiindulási [¹¹C]CO₂-ra vonatkoztatva az átlagos, bomlás-korrigált hozam 30% volt, így a szintézis végén átlagosan 904 MBq (24,5 mCi) [¹¹C]CSC-t termeltünk. A legjobb fajlagos aktivitás 9,1 TBq/μmol (246 mCi/μmol) volt.

7-[¹¹C]metil-sztirilxantin-származékok előállítása

Az általunk kifejlesztett rendszerben kísérleteket végeztünk további 1,3-dialkilsztirilxantin-származékok [¹¹C]metiljoddal való metilezésével.



Reakcióvázlat 7-[¹¹C]metil-sztirilxantin-származékok előállításához

A [¹¹C]metilezés kálium-karbonát jelenlétében, 70°C hőmérsékleten és 10 perc alatt nagyon jó radiokémiai hozammal ment végbe. Ilyen körülmények között a xantinszármazék kívánt 7-N-metilezése a meghatározó. A [¹¹C]metilezés termékeit a fentiekben bemutatott Rt-értékek segítségével azonosítottuk.

[¹¹C]Metilezési reakciók jellemzői

Prekurzor	Termék	mg prekurzor / ml DMF	Radiokémiai hozam* (%)	E-Z izomerizáció** (%)
SX	SC	1/0,6	62±3	nem észlelt
CSX	CSC	1/0,4	67±4	nem észlelt
ISX	ISC	1/0,6	90±4	4,4±0,5
NSX	NSC	1/0,6	51±5	1,1±0,5
3,4-DMSX	3,4-DMSC	1/1,0	93±4	35,2±3
3,5-DMSX	3,5-DMSC	1/0,5	89±5	nem észlelt
TMSX	TMSC	1/0,8	68±5	50,6±3
NSPrX	NSPrC	1/0,5	35±4	nem észlelt
3,4-DMDPrSX	3,4-DMDPrSC	1/0,7	72±5	nem észlelt
3,5-DMDPrSX	3,5-DMDPrSC	1/1,0	89±5	nem észlelt

*a szintézis végén, a kiindulási [¹¹C]metiljodidra számolva; ** egyensúlyi érték a mérés időpontjában

A fenti táblázatban a 7-[¹¹C]metil-sztilixantin-származékok előállításának reakcióhozamait mutatjuk be. A kapott eredmények 3-5, egymástól független szintézis átlagértékei. Az átlagos bomlás-korrigált hozamot a kiindulási [¹¹C]metiljodidra számoltuk. A [¹¹C]metiljodid aktivitását az automatikus szintézisrendszerben lévő, kalibrált detektor által mutatott beütésszámból határoztuk meg. A specifikus aktivitás 1,85 és 5,55 MBq/μmol (50-150 mCi/μmol) között volt. Ugyancsak az alábbi táblázatban mutatjuk be a reakcióelegyben a fény hatására végbemenő 7-[¹¹C]metil-sztilixantin-származékok *E-Z* izomerizációját.

A_{2A}-adenozinreceptor szelektivitás farmakológiai elemzése

A kontraktilitási vizsgálatok alapján kapott pA₂-értékek alapján megállapítottuk, hogy a koffein nem szelektív (azonos pA₂-értékek, egységnyi A_{2A}/A_{2B} és A_{2A}/A₁ arány). A CSC esetében az A_{2A}-szelektivitás (pA₂=6,49), főleg az A_{2A}/A_{2B} szelektivitás (56) szempontjából már jelentősnek mondható. A 3,5-DMSC (pA₂=6,58) és a 3,4,5-TMSC (pA₂=6,59) szintén szelektívek, de szelektitásuk nem éri el a CSC hatását. Igen figyelemreméltó azonban a jódsztilirkoffein mintegy 500x-os A_{2A}/A₁ szelektivitása (468), ami kiemelkedő a vizsgált purinerg-antagonisták között, ugyanakkor az A_{2A} affinitása (pA₂=7,67), csaknem akkora, mint a jelenlegi legerősebb A_{2A}-blokkoló ZM-vegyületé (pA₂=7,91).

Biológiai vizsgálatok

Az autoradiográfiás módszerrel elvégzett *in vitro* kompetíciós vizsgálatok szerint az agyszeleteken mért [¹¹C]CSC aktivitás mértéke mintegy 70-80%-al csökkent, ha a mintát 10μmol/l inaktív CSC jelenlétében inkubáltuk. A DDT1 MF2 sejtvonalon végzett kompetíciós vizsgálataink bizonyították, hogy a [¹¹C]CSC kötődése leszorítható inaktív CSC adenzinreceptor ligandummal. A ZM241385 A_{2A} antagonistája jelenlétében még fokozottabb volt a kompetíció mértéke. Hasonló

kompetíciót mutattunk ki a CSC és a CGS21680 között. A CGS egy nagy affinitású (Kd értéke 10nM) nagy szelektívitású A_{2A} agonista.

A [¹¹C]CSC specifikus kötődését in vivo PET vizsgálattal is bizonyítottuk, nyúlgyanban. Az állatokba intravénásan 1,5 mCi jelzett CSC-t és ezzel párhuzamosan különböző koncentrációban inaktív CSC-t injektáltunk. Az agyban mért radioaktivitás mértéke az inaktív CSC koncentráció növekedésével fokozatosan csökkent.

Az egér agyszeletekről és szívszeletekről készített autoradiográfias képek alátámasztják az A_{2A}-adenozinreceptorok feltételezett specifikus térbeli eloszlását. Az egér szervmegoszlás vizsgálatok azt mutatták, hogy az intravénás injekciót követően 10 perccel az akkumuláció a tüdőben a legmagasabb, majd ezt követi a máj, vese, szív és az agy.

Dinamikus PET-vizsgálattal követtük nyomon a [¹¹C]CSC-ligandum-receptor kötődésének kinetikáját. A PET-felvételeknek megfelelően, a farmakon injektálást követő első 15 másodperc alatt a radioaktivitás először a tüdőben jelenik meg, 1-2 perccel később a ligandum a vesékben, majd a májban halmozódik fel, és végül a hólyagban dúsul fel. A dinamikus PET-vizsgálatok során monitoroztuk a radiofarmakon szöveti felhalmozódását az egész állatban, továbbá artériás vérminták segítségével meghatároztuk a vérben lévő ligandumkoncentráció időbeli változását. A kapott eredményekkel meghatároztuk az egyes szervek és a vér [¹¹C]CSC-akkumuláció kinetikáját (aktivitás-koncentráció időbeli változása).

A [¹¹C]CSC kötődését reprezentáló, PET mérésből származó szöveti görbét és a vérvételi mérésekből származó véraktivitás görbét felhasználva, a 4 kompartmentes analízis alkalmazásával a vizsgálati idő függvényében meghatároztuk az illesztett szöveti görbét. A kinetikai számítások eredményeként megkaptuk a modellt leíró kinetikai állandók numerikus értékeit.

Összefoglaló

Tíz, ^{11}C -jelzett A_{2A} -antagonista típusú adenzinreceptor specificitással rendelkező 7-metilsztirilxantinszármazékot állítottunk elő. A 7-dezmetil-aminbázisok ^{11}C -izotóppal történő N-metilezése automatizált panelen történt. A jelölő izotópot hordozó metilcsoport beépítésének módszerét a CSC molekulára dolgoztuk ki, amely irodalmi adatok alapján a legígéretesebbnek receptorligandumnak tűnt. A reakcióhozamot a megfelelő savmegkötő kiválasztásával, valamint a hőmérséklet és a reakcióidő beállításával optimalizáltuk. A szintézis rendszert teszteltük, a hibaforrásokat kiszűrtük. A termék azonosítására és elválasztására analitikai és preparatív HPLC-módszereket dolgoztunk ki. A prekursorok, valamint az inaktív teszt vegyületek között két új vegyületet is előállítottunk.

Farmakológiai vizsgálataink alapján úgy tűnik, hogy az új ISC kiemelkedő A_{2A}/A_1 szelektivitással rendelkező purinerg-antagonista. Megállapíthatjuk továbbá, hogy a ^{11}C -jelzett xantin-származékok csoportja jól használható radiofarmakon az élő szövetek és szervek P1-típusú adenzinreceptor-kötőhelyeinek feltérképezésére. A PET-módszerrel, jelzett receptorligandumok segítségével *in vivo* tanulmányozhatók, többek között, a receptor-expresszió mértékének változása, illetve a receptor–ligandum kötődés kinetikája is.

A Ph.D. programban elért eredmények is hozzájárultak ahhoz, hogy a DEOEC PET Centrum Radiobiológiai munkacsoportjában az *in vivo* receptorkutatás alapjait megteremthettük. Az alkalmazott automatizált metilező technika, valamint a jelölt ligandumok vizsgálatára alkalmas biológiai modellek kialakítása és validálása alapját képezik a PET-el végzett *in vivo* receptorkutatás hazai alkalmazásának.

Az értekezésben felhasznált közlemények

1. **Boros I.**, Lengyel Zs., Balkay L., Horváth G., Szentmiklósi A.J., Fekete I., Márián T. Az A_{2A} -adenozin-receptor-eloszlás in vivo tanulmányozása ^{11}C -CSC-radioligandummal. Orvosi Hetilap. 143/21, Suppl. 2, 89-91,2002.
2. **Boros I.**, Horváth G., Lehel S., Márián T., Kovács Z., Szentmiklósi J., Tóth G., Trón L. [^{11}C]-labelling of some caffeine derivatives for mapping Adenosine A_{2A} receptors by PET technique. J. Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 242, 309-313, 1999. Impact factor: 0.605
3. Márián T., **Boros I.**, Lengyel Z., Balkay L., Horvath G., Emri M., Sarkadi E., Szentmiklósi J., Fekete I., Tron L.: Preparation and evaluation of [^{11}C]CSC as a possible tracer mapping adenosine A_{2A} receptors by PET. Appl. Rad. Isot. 50/5, 887-893, 1999. Impact factor: 0.716
4. Lengyel, Zs., **Boros, I.**, Márián, T., Sarkadi, E., Horváth, G., Kovács, Z., Trón,L.: Possible use of ^{11}C -labelled 8-(3-chlorostyryl) caffeine (CSC) mapping A_{2A} adenosine receptors in the CNS and myocardium. In Radioactive Isotopes in Clinical Medicine and Research XXIII . Eds: Bergmann H, Köhn H, Sinzinger H. Birkhauser Verlag 387-391, 1999.
5. Balkay L, Molnár T, **Boros I.**, Lehel Sz, Galambos T: Quantification of FDG uptake using kinetics models. In Positron Emission Tomography: A Critical Assessment of Recent Trends, edited by Gulyás, B. and Müller-Gärtner, H. W., Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. 153-162, 1998.
6. Trón L, Ésik O, Borbély K, ...Boros I, ...: Első hazai tapasztalatok pozitron emissziós tomográfiás (PET) vizsgálatokkal. Orvosi Hetilap, 138 (5), 259-271, 1997.

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó egyéb közlemények

1. Márián T., Rubovszky B., Szentmiklósi A. J., Tron L., Balkay L., **Boros I.**, Székely A., Krasznai Z.: A_1 and A_2 adenosine receptor activation inversely modulates potassium currents and membrane potential in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. 2002. Jpn. J. Pharmacol. 89, 366-372. 2002. Impact factor: 1.21
2. Lehel Sz., Horváth G., **Boros I.**, Trón L.: Investigation for the nucleophilic substitution reaction of [^{18}F]fluoride ion on the series of N^6 -benzoyl-2',3'-isopropylidene-adenosine-5'-sulfonates. J. Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 251, 309-312, 2002. Impact factor: 0.605
3. Mikecz P., Tóth Gy., Horváth G., Lehel S., Kovács Z., Priboczki É., **Boros I.**, Miklovicz T., Márián T., Radiógyógyszerek előállítása pozitronemissziós tomográfiai vizsgálatokhoz, Pozitronemissziós tomográfia Magyarországon: Eredmények a klinikumban és a kutatásban. Orvosi Hetilap. 143/21, Suppl. 2, 12-14, 2002.

4. Gulyás B., Csiba L., ...**Boros I.**, ...: Egyszeri vinpocetin (cavinton) infúzió agyi anyagcserére gyakorolt hatásának vizsgálata pozitron emissziós tomográfiával (PET) krónikus stroke betegekben. Orvosi Hetilap, 142(9), 443-447, 2001.
5. Lehel Sz., Horváth G., **Boros I.**, Mikecz P., Márián T., Szentmiklósi J., Trón L.: Synthesis of 5-N-(2-[¹⁸F]Fluoroethyl)-carboxamidoadenosine: a promising tracer for investigation of adenosine receptor system by PET technique. J. Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals, 43, 807-815, 2000. Impact factor: 0.941
6. Lehel Sz., Horváth G., **Boros I.**, Mikecz P., Márián T., Trón L., Production of 5'-deoxy-5'-[¹⁸F]fluoro-adenosine in the nucleophilic radiofluorination reactions of 5'-deoxy-5'-haloadenosine derivatives. J. Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 245, 399-401, 2000. Impact factor: 0.605
7. Szakáll S., **Boros I.**, Balkay L., Emri M., Fekete I., Kerényi L., Lehel S., Márián T., Molnár T., Varga J., Bereczki D., Csiba L., Gulyás B.: Cerebral effects of a single dose of intravenous vinpocetine in chronic stroke patients: a PET study. J. Neuroimaging, 8(4): 197-204, 1998. Impact factor: 1.044
8. Trón L., Balkay L., **Boros I.**, Emri M., Márián T., Molnár T., Tóth Gy., Gulyás B.: Positron Emission Tomography (PET)- One of the most advanced imaging techniques, Neurobiology 3 (2), pp. 205-206, 1995.

Az értekezéshez kapcsolódó előadások, poszterek

1. Márián T., Lehel S., Balkay L., **Boros I.**, Horváth G., Fekete I., Szentmiklósi J., Trón L., Adenozin-receptorok és PET-izotóppal jelölt ligandumjaik kölcsönhatásának in vivo és in vitro vizsgálata. Ötéves a Magyar PET Program, Tudományos Ülés, 1999. szeptember 22., Debrecen.
2. Márián T., **Boros I.**, Lengyel Zs., Szentmiklósi J., Fekete I., Balkay L., In vivo és in vitro vizsgálatok PET radiofarmakonokkal. DOTE PET Centrum Tudományos Ülés 1999. február 22., Debrecen.
3. Szentmiklósi J., **Boros I.**, Horváth G., Márián T.: Halogénezett sztirikoffein származékok, mint potenciális PET tracerek: az A_{2a} adenozin receptor szelektivitás farmakológiai elemzése. DOTE PET Centrum, Tudományos Ülés 1999. február 22., Debrecen.
4. Lengyel Zs., **Boros I.**, Márián T., Sarkadi E., Horváth G., Kovács Z., Trón L., Possible use of ¹¹C-labelled 8-(3-chlorostyryl) caffeine (CSC) mapping A_{2A} adenosine receptors in the CNS and myocardium. Eur. J. Nucl Med. 1998, 24(1), S20 (Radioactive Isotopes in Clinical Medicine and Research, 23rd Int.Symposium, Badgastein, Austria, Januar 13-16, 1998.)
5. Lengyel Zs., **Boros I.**, Márián T., Sarkadi É., Szentmiklósi J., Horváth G., Trón L. (1997): In vivo and in vitro investigations with ¹¹C-labeled 8-(3-chlorostyryl)caffeine (CSC) as a possible PET tracer for mapping A_{2A} adenosine

receptors in the CNS and myocardium. Fifth Symposium of International Society for Neuroimaging in Psychiatry, Groningen, November 27-29, 1997, pp. 29.

6. Horváth G., Márián T., **Boros I.**, Lengyel Zs., Lehel S., Kovács Z., Szentmiklósi J., Trón L., [¹¹C]-labeled 8-(3-chlorostyryl)caffeine (CSC) as a possible PET tracer for mapping A_{2A} adenosine receptors in the CNS and myocardium. Conference on Achievements and Prospects of new Radiotracers, 13-14 November, 1997, Jülich, Germany, pp: 17-18.
7. **Boros I.**, Horváth G., Lehel Sz., Kovács Z., Márián T., Sarkadi L-né., Trón L., A₂ szelektív adenzin receptorligandum antagonisták előállítására a DOTE PET Centrumban. Konferenciaposzter és előadás, MONT X. Kongresszus, Bükkfürdő, 1997 szeptember, Magyar Radiológia Supplement 1997(1), 12.
8. **Boros I.**, Horváth G., Lehel S., Trón L., Radiokémiai fejlesztési programok a debreceni PET Centrumban, Konferenciaposzter és előadás, MONT X. Kongresszus, Bükkfürdő, 1997 szeptember, Magyar Radiológia, 1997(1) 12.
9. Lehel S., Horváth G., **Boros I.**, Trón L., Adenzin receptorok vizsgálatára alkalmas ¹⁸F-jelzett vegyületek előállítása, Konferenciaposzter és előadás, MONT X. Kongresszus, Bükkfürdő, 1997 szeptember, Magyar Radiológia, 1997(1), 12.
10. Balkay L., Emri M., Molnár T., Márián T., **Boros I.**, Lehel Sz., Trón L. (1997) Kvantitatív szöveti glukóz anyagcsere térképek előállítása PET mérések tracer kinetikai analízisével. Poszter, Sejt- és fejlődésbiológiai napok, Debrecen, 1997. jan.19-22.pp. 23.
11. **Boros I.**, Lehel S., Tóth Gy., Trón L. [¹⁸F]Fluoride production at the Debrecen PET Centre, conference poster, XXI-st World Conference of the International Society for Fluoride Research, Budapest, Hungary, August 1996 (conference book p54).
12. Lehel S., **Boros I.**, Tóth Gy., Trón L. 2,3-O-isopropylidene 5-triflic-adenosine: a promising precursor for the synthesis of [¹⁸F]-labelled adenosine derivatives, conference poster, XXI-st World Conference of the International Society for Fluoride Research, Budapest, Hungary, August 1996 (conference book p53).
13. Illés A., Márián T., **Boros I.**: PET studies on Hodgkin's lymphoma patients "PET in Eastern and Central Europe", International Workshop, Debrecen, Hungary, 23-25 May 1996.