

P2-receptorer viktiga för framtida läkemedel

På senare tid har ett stort antal receptorer för extracellulära nukleotider (P2-receptorer) klonats vilka förmedlar en mängd effekter i hjärt-kärlsystemet: inotropa effekter på hjärtat, trombocyttaggregation, blodtrycksreglering, frisättning av endoteliala faktorer och stimulering av glatt muskeltillväxt. Redan idag står det klart att P2-receptorer är fysiologiskt och patofysiologiskt av stor betydelse. De första P2-receptorblockerarna (tiklopidin och klopidogrel) används kliniskt som trombocythämmare vid ischemisk hjärtsjukdom och slaganfall. Fortsatta studier och utvecklingen av selektiva antagonister mot P2-receptorer kommer att ge oss en större förståelse för flera kardiovaskulära sjukdomsprocesser och förhoppningsvis leda till utvecklingen av nya läkemedel.

P2-receptorer är cellytereceptorer som aktiveras av extracellulära nukleotider såsom ATP (adenosintrifosfat), ADP (adenosindifosfat), UTP (uridintrifosfat) och UDP (uridindifosfat). Intracellulärt spelar nukleotider en fundamental roll i energiomsättning, enzymreglering och som byggstenar i genomet.

Det bemöttes därför med viss skepsis när det antogs att nukleotider även skulle kunna aktivera receptorer på cellytan. Det var först i och med att dessa P2-receptorer klonades som det slutgiltiga beviset för deras existens kom. Nu är P2-receptorer en av de största receptorfamiljerna med drygt ett tiotal subtyper

per som utövar en mängd kardiovaskulära effekter.

Drygt tiotal subtyper med specifik känslighet

Det var känt sedan 1920-talet att adenosin utövade effekter på hjärtfunktion och blodtrycksreglering. Efter hand kom det indikationer på att adenosinmolekyler med två eller tre fosfatgrupper (ADP och ATP) utövade effekter inte bara via sin nedbrytning till adenosin utan via egna receptorer. Detta ledde till att professor Geoffrey Burnstock 1978 föreslog en indelning av purinerga receptorer i adenosinkänsliga (P1) och ATP-känsliga (P2) [1]. Betydelsen av P har modifierats till att stå för både purin- och pyrimidinkänslighet eftersom pyrimidiner som UTP och UDP också aktiverar ett stort antal av dessa receptorer [2].

När P2-receptorerna klonades visade det sig att de bestod av två huvudgrupper, där P2X-receptorerna representerar en helt ny typ av jonkanalsreceptor medan P2Y-receptorerna tillhör den stora gruppen G-proteinkopplade receptorer (se Faktaruta). Det finns åtminstone sju subtyper av P2X-receptorer (P2X₁-P2X₇) som alla aktiveras av ATP. För P2Y-receptorerna är fem subtyper klonade, och de har specifik känslighet för olika puriner (ATP, ADP) eller pyrimidiner (UTP, UDP). Dessutom finns en ännu inte klonad ADP-känslig trombocytreceptor, P2Y_{ADP}.

Frisättning av nukleotider

Extracellulära nukleotider frisätts samtidigt som noradrenalin när det sympatiska nervsystemet aktiveras men även från sensoriska nerver. Endotelceller frisätter både ATP och UTP vid hypoxi och förändringar i »shear stress» [3]. Det är möjligt att det sker en ständig frisättning från endotelet som skulle kunna delta i den basala blodflödesregleringen. Frisättning sker också från inflammatoriska celler och från glatta muskelceller vid skada. I hjärtat sker en kraftig frisättning i samband med ischemi, troligen både från sympatikus, röda blodkroppar och hjärtmuskelceller. Trombocytgranula innehåller mer än 600 mmol/l ATP och ADP, vil-

ket leder till mycket höga koncentrationer av extracellulära nukleotider i samband med trombocyttaggregation [3]. Således frisätts extracellulära nukleotider i alla delar av hjärt-kärlsystemet

FAKTARUTA

Receptorklassificering

P2-receptorer aktiveras av puriner och pyrimidiner med två eller tre fosfatgrupper (ATP, ADP respektive UTP och UDP) och utgör en egen receptorgrupp skild från gruppen adenosinreceptorer. P2-receptorerna indelas i P2X och P2Y-receptorer (Tabell I) [21]. P2X-receptorerna representerar en helt ny klass av jonkanalkopplade receptorer som vid aktivering släpper in positivt laddade molekyler (Ca²⁺, K⁺ och Na⁺) vilket leder till en depolarisering av membranpotentialen och en aktivering av cellen. I gruppen finns sju subtyper som alla aktiveras av ATP. P2X₁ är den dominerande receptortypen på glatta muskelceller i blodkärl och stimulerar till kärlkontraktion. De övriga uttrycks huvudsakligen i neurogen vävnad. P2X₇-receptorn är unik, eftersom den vid aktivering med höga koncentrationer ATP kan föra samman många receptorer till att bilda en por stor nog att släppa igenom större molekyler (700 dalton). Den finns bl a på makrofager och deltar troligen i bildandet av multinukleära celler.

P2Y-receptorerna tillhör den stora gruppen receptorer med sju transmembrana regioner som är kopplade till intracellulära G-protein. Flera receptorer har sorterats bort från listan då det i efterhand visat sig att de inte aktiverades av nukleotider eller att de var artvarianter av varandra. Detta förklarar den oregelbundna numreringen. Som framgår av Tabell I så finns en stor specificitet för vilken ligand som kan binda till varje receptor. P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ och P2Y₁₁ stimulerar frisättning av den intracellulära signalsubstansen IP₃ medan P2Y_{ADP} verkar genom att hämma bildningen av cAMP. P2Y_{ADP} är inte klonad ännu, men det är flera forskningsgrupper som arbetar intensivt med detta. Det finns dessutom indikationer på att det skulle finnas ytterligare några P2-receptorer.

Författare

DAVID ERLINGE

med dr, leg läkare, medicinkliniken, Universitetssjukhuset i Lund.
e-post: david.erlinge@med.lu.se

Tabell I. Receptorklassificering.

P2-receptorer			
P2X	Aktiveras av	P2Y	Aktiveras av
P2X ₁	ATP	P2Y ₁	ADP
P2X ₂	ATP	P2Y ₂	ATP/UTP
P2X ₃	ATP	P2Y ₄	UTP
P2X ₄	ATP	P2Y ₆	UDP
P2X ₅	ATP	P2Y ₁₁	ATP
P2X ₆	ATP	P2Y _{ADP}	ADP
P2X ₇	ATP		

och i ökad utsträckning i flera patofysiologiska situationer [3].

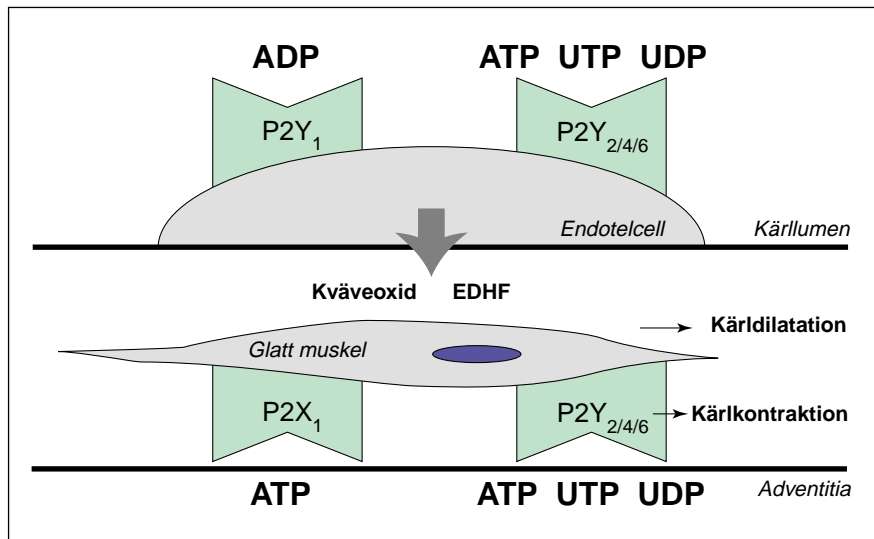
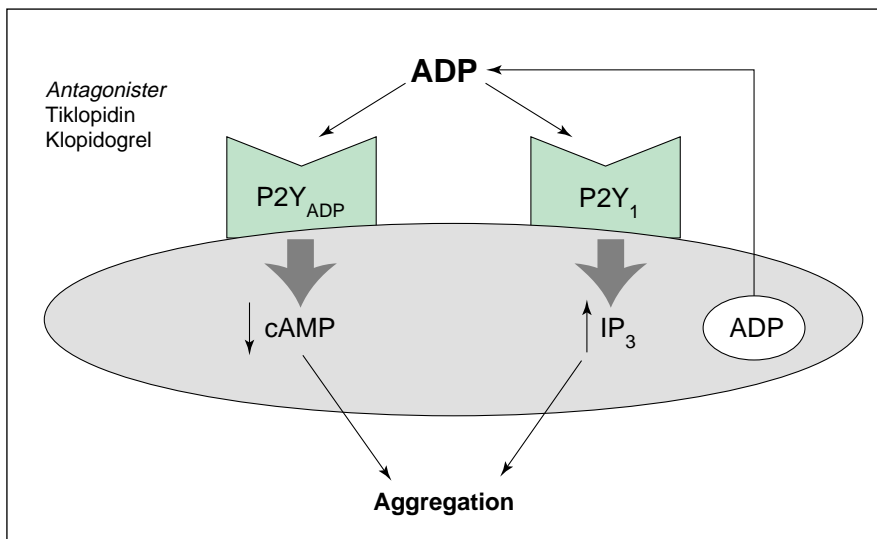
Rik förekomst av nedbrytande enzymer

De extracellulära nivåerna av nukleotider i cirkulationen är i det närmaste obefintliga. Orsaken till detta är en rik förekomst av nedbrytande enzymer, ektonukleotidaser, framför allt på endotelceller som bryter ner ATP, via ADP och AMP, till adenosin. Detta leder till att ATP har en mycket kort halveringstid (0,2 sekunder vid infusion i lungcirkulationen). Det är tänkbart att effekterna av extracellulära nukleotider skulle bli alltför kraftiga om serumkoncentrationerna inte hölls nere.

ADP dubbel effekt på trombocyttaggregationen

ADP är ett av kroppens mest potenta trombocyttaggregerande ämnen, och nyligen har mekanismen bakom detta klargjorts. ADP stimulerar två olika receptorer på trombocytens yta, en receptor som minskar de intracellulära nivå-

Figur 1. Den kraftiga trombocyttaggregerande effekten av ADP förklaras genom en synergistisk effekt via P2Y_{ADP} och P2Y₁-receptorer, vilka verkar via olika intracellulära signalvägar (hämmning av cAMP respektive stimulering av IP₃). P2Y_{ADP}-receptorn blockerar av tiklopidin och klopidogrel.



Figur 2. Extracellulära nukleotider reglerar kärntonus via ett flertal receptorer. Vid frisättning i kärllumen på endotelsidan aktiveras P2Y₁-receptorer av ADP. Dessutom finns det receptorer känsliga för UTP och UDP (P2Y₂, P2Y₄ och P2Y₆), men eftersom det saknas tillräckligt receptorspecifika molekyler har man ännu inte säkert kunna skilja ut vilken eller vilka av dessa receptorer som uttrycks av endotelceller. De har därför sammanfattats som P2Y_{2/4/6}-receptorer. När endotelcellen aktiveras frisätts kväveoxid och EDHF som leder till relaxation av den glatta muskelcellen och kärldilatation. När extracellulära nukleotider frisätts mot adventitia eller om endotelet är skadat stimuleras P2-receptorer direkt på den glatta muskelcellen. Här saknas P2Y₁-receptorer men till skillnad från på endotelcellen finns det P2X₁-receptorer. Dessutom finns UTP och UDP-känsliga P2Y_{2/4/6}-receptorer. Aktivering av dessa receptorer leder i stället till kärilskontraktion.

erna av cAMP (P2Y_{ADP}) och en (P2Y₁) som ökar nivåerna av inositoltrifosfat (IP₃) [4]. Båda dessa effekter bidrar i sig till trombocyttaggregation, men det är synergismen när båda aktiveras som förklarar den potenta trombocyttaggregerande effekten för ADP (Figur 1). Eftersom ADP ligger lagrat i höga koncentrationer i trombocytgranula, leder en aktivering av trombocytten till ytterligare frisättning av ADP varpå trombocyttaggregationen stimuleras ytterligare.

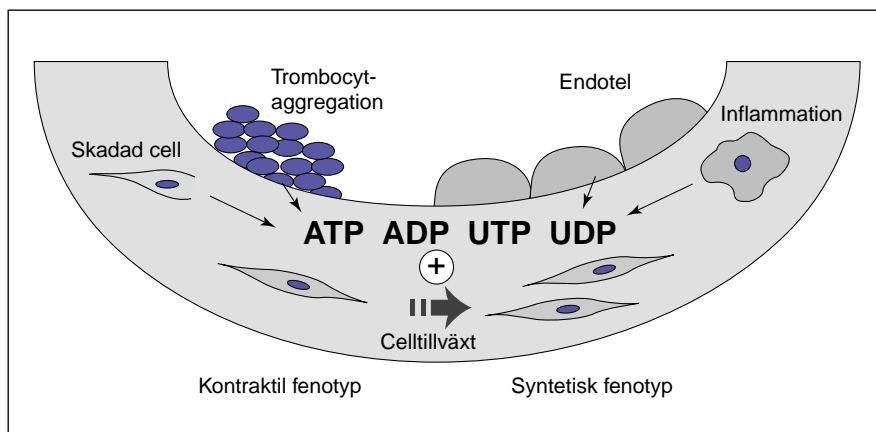
Läkemedel riktade mot P2-receptorn

De första läkemedel som verkar via P2-receptorer är trombocytthämmarna tiklopidin (Ticlid) och klopidogrel (Plavix). Dessa blockerar bindningen av ADP till P2Y_{ADP}-receptorn och hämmar den ADP-stimulerade trombocyttaggregationen. Effekten är helt annorlunda än för acetylsalicylsyra som hämmar tromboxansyntesen. CAPRIE-studien visade att klopidogrel var mer effektivt än acetylsalicylsyra för att reducera incidensen av slaganfall och hjärtinfarkt

[5], och kombinationen acetylsalicylsyra och klopidogrel har visat sig överlägsen andra blodförtunnande medel för att förhindra komplikationer till PTCA (ballongvidgning) med stent [6]. Detta är dels ett första bevis för möjligheterna att designa kliniskt verksamma läkemedel riktade mot P2-receptorer, dels bekräftar det indirekt förekomsten av ADP i fysiologiskt relevanta nivåer i människans cirkulation. Av ytterligare intresse är att vi nu vet att ADP även utövar sin trombocyttaggregerande effekt via P2Y₁-receptorn. Detta lämnar fältet öppet för ytterligare farmakologisk intervention.

Effekter på blodtryck och kärntonus

Extracellulära nukleotider utövar effekter på kärntonus i merparten av de blodkärl och kärilbäddar som undersökts. P2-receptorer finns både på endotel, där de medierar kärldilatation, och glatt muskel, där de stimulerar kärilskontraktion (Figur 2). När sympatiska nervsystemet aktiveras frisätts ATP



Figur 3. ATP, ADP, UTP och UDP frisätts i nära anslutning till de glatta muskellerna vid kärlskada, förändringar i »shear stress», trombocytaggregation och inflammation i situationer som är förknippade med utvecklingen av ateroskleros och neointima efter PTCA. De tillväxstimulerande effekterna av dessa extracellulära nukleotider på den glatta muskellen kan därför bidra till utvecklingen av kärlsjukdom.

samtidigt med noradrenalin och står för en del av kärilskontraktionen. ATP verkar på både P2X₁ och olika P2Y-receptorer på den glatta muskellens yta. Noradrenalin står i regel för en större del av kontraktionen, men det finns kärlsystem där ATP medierar hela den sympatikusmedierade kontraktionen [7]. ATP-kontraktionen är ofta större än den som styrs av noradrenalin vid låg sympatikusstimulering medan noradrenalin tar över helt vid kraftigare stresspådrag. Det är möjligt att P2-receptorerna är viktiga i sympatiska nervsystemets kontinuerliga fininställning av perifer resistans och blodtryck. Man har också sett en ökning av ATP-komponenten i den sympatikusmedierade kontraktionen i djurmodeller för hypertoni [8].

Endotelceller uttrycker ett flertal P2Y-receptorer som medierar kärildilatation via frisättning av kväveoxid (NO) och prostaglandiner [7]. Vi har nyligen kunnat visa att de även stimulerar till frisättning av EDHF (endothelium derived hyperpolarising factor) [9, 10], en kärilvidgande faktor som kan vara av lika stor betydelse som kväveoxid, speciellt i perifera resistanskärl. Dessutom kan den P2-stimulerade EDHF-dilatationen kompensatoriskt öka i situationer när den kväveoxidmedierade kärilvidgningen är försvagad, till exempel vid hjärtsvikt [11]. Utöver frisättning av dilatatoriska substanser har djurstudier också visat att P2-receptorer på endotelet medierar frisättning av »platelet activating factor» (PAF) och t-PA.

Kontraktilla och dilaterande effekter balanserar varandra

De kontraktilla och dilaterande effekterna av P2-receptorer balanserar varandra. Den slutgiltiga effekten är beroende på receptoruppsättningen i kärilbädden, vilka nukleotider som frisätts och om detta sker på endotelsidan eller mot adventitia (Figur 2). Eftersom nerverna från det sympatiska nervsystemet löper i adventitia kommer frisatt ATP att verka på glatta muskeller och ge kärilskontraktion. Nukleotider

som frisätts i kärllumen från trombocyter, röda blodkroppar eller endotelceller aktiverar i stället endotelceller och ger kärildilatation. Om däremot endotelet är skadat kommer balansen att rubbas och den kärilkontraktilla effekten att överväga.

Effekterna på hjärtat ofullständigt utredda

Uttrycket av ett flertal av de kända P2-receptorerna har påvisats på mRNA-nivå i myokard, men deras effekter är ofullständigt utredda [12]. Adenosins effekter på det humana hjärtat är däremot välkända och utnyttjas i klinisk praxis vid bl a supraventrikulära arytmier. ATP tillfört systemiskt, eller i koronarkärlsbädden, har en kraftig kärilvidgande och frekvensreglerande verkan, men detta medieras av adenosin bildat vid ATPs så gott som omedelbara nedbrytning. I avsaknad av selektiva P2-receptorantagonister har P2-receptorernas fysiologiska roll varit svår att utvärdera in vivo. I in vitro-försök har man dock visat positiva inotropa och kronotropa effekter för både ATP och UTP medierade via P2-receptorer [13], dvs motsatta effekter till adenosin. Eftersom höga nivåer av ATP frisätts i hjärtat vid hypoxi är det möjligt att P2-receptorer på myocyterna påverkar infarktutveckling och arytmiägenhet [14].

Det finns indikationer på att P2-receptorer kan spela en roll i utvecklingen av hjärtsvikt. Dels är adenosinnivåerna i blodet förhöjda hos patienter med hjärtsvikt, vilket skulle kunna återspegla en ökad ATP-frisättning [15], dels har vi funnit en specifik uppreglering av

mRNA för P2X₁ och P2Y₂-receptorer i myokard från råttor som lider av hjärtsvikt sekundärt till experimentellt utlöst hjärtinfarkt [16].

Tillväxstimulerande effekter

Tillväxt av glatta muskeller sker i patofysiologiska situationer som i aterosklerotiska plack och i neointiman som ger restenos efter PTCA. Både ATP och UTP stimulerar tillväxt av glatta muskeller via P2Y-receptorer [17]. Den mitogena effekten förmedlas genom att P2Y-receptorer aktiverar Gq-protein som via proteinkinase C stimulerar ett flertal intracellulära händelser som är nödvändiga för celledelning, t ex DNA-syntes, proteinsyntes, uttryck av »immediate early genes», cellcykelprogression och tyrosinfosorylering [17]. Denna effekt är i våra försök betydligt större än för angiotensin, noradrenalin och endotelin, faktorer som ofta diskuteras som viktiga mitogena agens i den vaskulära remodeleringsprocessen.

Dessutom har ATP och UTP visat sig utöva en stark synergistisk effekt tillsammans med klassiska tillväxsfaktorer som PDGF, IGF-1, insulin, EGF och bFGF. Ofta frisätts nukleotider tillsammans med dessa tillväxsfaktorer i nära anslutning till de glatta muskellerna vid kärilskada, trombocytaggregation samt från inflammatoriska celler och kan därför vara av betydelse i utvecklingen av ateroskleros och neointima efter PTCA (Figur 3). De mitogena effekterna av ATP verkar också synergistiskt med andra ämnen som frisätts från sympatiska nerver (noradrenalin och neuropeptid Y), vilket skulle kunna innebära att ATP är av betydelse även för utvecklingen av den kärilväggshypertrofi som ses hos patienter med högt blodtryck.

Receptorreglering i glatta muskeller

Den glatta muskellen kan förändras från kontraktill fenotyp till en syntetisk fenotyp som är en mer fibroblastlik cell vilken förlorat sin kontraktilla förmåga och i stället börjat producera matrixproteiner och receptorer för tillväxsfaktorer [18]. Detta är en viktig del i utvecklingen av olika sorters kärlsjukdom. Vi har nyligen infört en metod för att kvantifiera uttrycket av P2-receptorer på mRNA-nivå i glatta muskeller och funnit att den syntetiska fenotypen uttrycker färre kontraktilla P2X₁-receptorer, men fler mitogena P2Y-receptorer än den kontraktilla fenotypen. Detta stämmer väl med cellens övriga förändringar i samband med ändringen av fenotyp och stärker intrycket av att P2-receptorerna är av betydelse i aterosklerosutvecklingen.

Vi har också kunnat visa att de kontraktilla P2X₁-receptorerna är selektivt

nedreglerade i perifera resistanskärl vid hjärtsvikt, både på mRNA- och receptornivå [20]. Detta är i analogi med nedregleringen av adrenerga β -receptorer och angiotensin II (AT_1)-receptorer vid hjärtsvikt och skulle kunna representera en respons på ökad ATP-frisättning från ett överaktiverat sympatiskt nervsystem.

Möjligheter till läkemedelsutveckling

Det stora antalet P2-receptorer ger möjligheter till att designa läkemedel med hög selektivitet och färre biverkningar. Redan idag är P2-receptorblockerarna tiklopidin och klopidogrel i kliniskt bruk vid PTCA med stentläggning, ischemisk hjärtsjukdom och slaganfall. Vi har potentiella farmakologiska angreppspunkter genom ytterligare en P2-receptor på trombocyter. Vidare skulle antagonister till den kontraktila P2X₁-receptorn på den glatta muskelcellen kunna användas i behandlingen av hypertoni och eventuellt hjärtsvikt. Agonister till endoteliala P2-receptorer skulle kunna fungera som kärl-dilaterare eller för att frisätta endotelfaktorer. Myokardiets P2-receptorer lämnar också utrymme för utveckling av läkemedel med positivt inotropa effekter att användas vid kardiogen chock.

För att realisera denna farmakologiska behandlingspotential måste vi nå djupare kunskap om varje enskild P2-receptors funktion. Vi måste veta vilka receptorer som uttrycks i olika delar av hjärt-kärlsystemet och hur uttrycket förändras i olika sjukdomstillstånd. Selektiva receptorantagonister håller på att utvecklas som kan att ge oss mer kunskap om de olika receptortypernas funktion och ge substanser som kan användas för läkemedelsutveckling.

Referenser

1. Burnstock G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptors. In: Straub L, ed. Cell Membrane receptors for drugs and hormones: A Multidisciplinary approach. New York: Raven, 1978: 107-18.
2. Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA et al. Nomenclature and classification of purinoceptors. Pharmacol Rev 1994; 46: 143-56.
3. Gordon JL. Extracellular ATP: Effects, sources and fate. Biochem J 1986; 233: 309-19.
5. CAPRIE, s. c. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischemic events (CAPRIE). Lancet 1996; 348: 1329-39.
7. Ralevic V, Burnstock G. Roles of P2-purinoceptors in the cardiovascular system. Circulation 1991; 84: 1-14.
9. Malmsjö M, Edvinsson L, Erlinge D. P2U-receptor mediated endotheliumdependent but nitric oxide-independent vascular relaxation. Br J Pharmacol 1998; 123: 719-29.
13. Piroton S, Desgranges C, Vassort G, Boey-

naems JM. The role of nucleotide receptors in the cardiovascular system. In: Turner JT, Weisman GA, Fedan JS, eds. The P2 nucleotide receptors. Totowa, New Jersey: Humana press, 1998: 319-59.

17. Erlinge D. Extracellular ATP: a growth factor for vascular smooth muscle cells. Gen Pharmacol 1998; 31: 1-8.
18. Thyberg J. Differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells in culture. Int Rev Cytol 1996; 169: 183-265.
19. Erlinge D, Hou M, Webb TE, Barnard EA, Möller S. Phenotype changes of the vascular smooth muscle cell regulate P2 receptor expression as measured by quantitative RT-PCR. Biochem Biophys Res Commun 1998; 248: 864-70.
21. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. Pharmacol Rev 1998; 50: 413-92.

Fullständig litteraturlista kan erhållas från David Erlinge, Cellbiologisk forskningsavdelning 1, EB-blocket, Universitetssjukhuset, 221 85 Lund.

Summary

New cardiovascular treatment options; P2 receptors important targets for future drugs

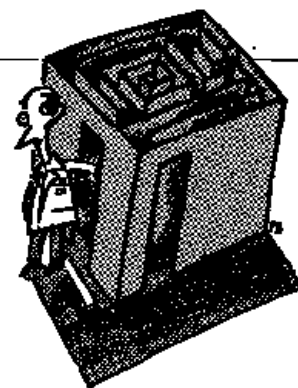
David Erlinge

Läkartidningen 1999; 96: 2586-8.

Several receptors activated by extracellular nucleotides (ATP, ADP, UTP and UDP) have recently been cloned. These P2 receptors mediate a multitude of cardiovascular effects such as positive inotropic effects in the heart, platelet aggregation, release of endothelial factors, growth stimulation of vascular smooth muscle cells, vasomotor effects and blood pressure regulation. The physiological and pathophysiological importance of P2 receptors is established, and the first P2 receptor antagonists (ticlopidine and clopidogrel) are already in clinical use as inhibitors of platelet aggregation in the prevention of ischaemic heart disease and stroke. The development of selective antagonists for other P2 receptor subtypes will lead to better understanding of cardiovascular disease processes and yield new therapeutic options.

Correspondence: Dr David Erlinge, Dept of Medicine, Lund University, University Hospital, SE-221 85 Lund, Sweden.

E-mail: david.erlinge@med.lu.se



**enligt
min
erfarenhet**

Läkartidningens serie 1990-1992 i särtryck

När konsensus saknas om hur läkaren bör behandla, spelar den beprövade erfarenheten stor roll. Det 48-sidiga häftet innehåller 32 korta, praktiskt inriktade artiklar med anknytning till vårdens vardag och vänder sig till alla kliniskt verksamma läkare. Förutom diagnostik med terapi speglas goda exempel på prevention, ledningsfrågor och administration.

Pris 55 kr. Vid 11-50 ex 50 kr, vid högre upplagor 47 kr/ex.

Beställ här:

..... exemplar av
Enligt min erfarenhet

Namn

Adress.....

Sändes till Läkartidningen,
Box 5603, 114 86 Stockholm

Märk gärna kuvertet med
»Enligt min erfarenhet»

Beställning per fax:
08-20 76 19