

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A foszfodiészteráz inhibitor drotaverin hatásának vizsgálata az intracelluláris Ca^{2+} újratöltődési mechanizmusra simaizom preparátumon

Patai Zoltán

Témavezető: Prof. Dr. Guttman András



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2018.

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	4
2. Bevezetés.....	6
3. Irodalmi áttekintés.....	7
3.1. Légúti megbetegedések osztályozása.....	7
3.1.1. Az obstruktív tüdőbetegségek epidemiológiája.....	8
3.1.2. Az asztma és a COPD tünetei, kóroka.....	9
3.1.3. Kezelési lehetőségek.....	10
3.2. Tengerimalac, mint asztma és COPD modell.....	12
3.2.1. A tengerimalac légutak autonómiája és fiziológiája.....	12
3.2.2. Tengerimalac légutainak beidegzése.....	13
3.2.3. Szignáltranszdukció tengerimalacokban és emberekben.....	15
3.2.4. Membránpotenciál tengerimalacokban és az emberben.....	16
3.3. Légúti simaizom tónusának szabályozása.....	17
3.3.1. Ca^{2+} szerepe a légúti simaizom tónusának szabályozásában.....	17
3.3.2. A farmako-mechanikai kapcsolat.....	17
3.3.3. Elektro-mechanikai kapcsolat.....	19
3.4. A cAMP szerepe a légúti simaizom tónus szabályozásában.....	20
3.4.1. cAMP és Ca^{2+} kapcsolata.....	22
3.5. A légúti simaizom relaxáció lehetőségei.....	22
3.6. β_2 -adrenoreceptor agonisták.....	23
3.7. Guanilat-cikláz aktivátorok.....	23
3.8. Foszfodiészteráz-gátlók.....	24
3.8.1. Teofillin.....	25
3.8.2. Papaverin.....	26
3.8.3. Drotaverin.....	26
3.9. A Ca^{2+} influx gátlása.....	27
3.9.1. Nifedipin.....	28
3.9.2. Diltazem.....	28
3.10. Vazoaktív intesztinális peptid.....	29
4. Célkitűzések.....	30
5. Anyagok és módszerek.....	31
5.1. Vegyszerek.....	31
5.2. Állatok.....	31

5.3. Oldatok	31
5.4. Módszerek	32
5.4.1. Légcső izolációja és preparálása szervfürdőhöz	32
5.4.2. Hisztamin, metakolin és KCl EC ₅₀ értékének a meghatározása	34
5.4.3. KCl kiváltotta kontrakció vizsgálata	34
5.4.4. Nyugalmi újratöltődés vizsgálata	35
5.4.5. Receptor aktivációt követő intracelluláris Ca ²⁺ refill (CaCl ₂ kiváltott kontrakció)	35
5.4.6. Összehúzott preparátum ernyesztése	36
5.4.7. Kontrakció kialakulásának gátlása	36
6. Eredmények	38
6.1 KCl EC ₅₀ értékének meghatározása	38
6.2. Hisztamin EC ₅₀ értékének meghatározása	39
6.3. Metakolin EC ₅₀ értékének meghatározása	40
6.4. Drotaverin hatásának vizsgálata KCl kiváltotta kontrakción	41
6.5. Drotaverin hatásának vizsgálata intracelluláris Ca ²⁺ raktárak újratöltődésére	44
6.6. CaCl ₂ -kiváltotta kontrakció vizsgálata agonistát tartalmazó Ca ²⁺ mentes oldatban	49
6.7. A CaCl ₂ kiváltotta kontrakció meredekségének vizsgálata	54
6.8. Összehúzott preparátum ernyesztésének vizsgálata	57
6.9. A kontrakció kialakulásának gátlása	59
7. Megbeszélés	62
7.1. Drotaverin hatása a depolarizáció kiváltotta légúti simaizom kontrakcióra	63
7.2. Drotaverin hatásának vizsgálata intracelluláris Ca ²⁺ raktárak újratöltődésére	64
7.3. CaCl ₂ -kiváltotta kontrakció vizsgálata agonistát tartalmazó Ca ²⁺ mentes oldatban	66
7.4. Összehúzott preparátum ernyesztésének vizsgálata	67
7.5. A kontrakció kialakulásának gátlása	69
8. Összegzés	71
9. Summary	73
10. Hivatkozások	75
11. Tárgyszavak	89
12. Köszönetnyilvánítás	90
13. Függelék	91

1. Rövidítések jegyzéke

Ach	acetilkolin
AC	adenilát-cikláz
ANP	atriális nátriuretikus peptid
ADRB2	Béta ₂ adrenerg-receptor
ATP	adenozin-trifoszfát
BK _{Ca}	nagy vezetőképességű Ca ²⁺ -aktivált K ⁺ csatorna
(Ca ²⁺) _i	intracelluláris szabad kalcium ion
CaM	Ca ²⁺ -kalmodulin komplex
cAMP	ciklikus adenzin-monofoszfát
cGMP	ciklikus guanozin-monofoszfát
CLCA	Ca ²⁺ -függő Cl ⁻ csatorna
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
COX-2	ciklooxigenáz-2
DAG	diacil-glicerol
ET	endotelin
ER	endoplazmatikus retikulum
FEF	maximális kilégzési áramlás
FEV 1	első másodperc alatt kilégtett levegő mennyisége
FRC	funkcionális reziduális kapacitás
FVC	erőltetett vitálkapacitás
GMP	guanozin-monofoszfát
GPCR	G-fehérjéhez kapcsolt receptor
H1R	Hisztamin 1 receptor
H3R	Hisztamin 3 receptor
HDAC	hiszton deacetiláz
HSP ₂₀	hősokkfehérje 20

K _v	késleltett rektifikációjú K ⁺ csatorna
IL	interleukin
L-VOCC	feszültség függő L-típusú kalcium csatorna
MLC	miozin könnyű lánc
MLCK	miozin könnyű lánc
MP	miozin foszfatáz
NANC	nem adrenerg nem kolinerg
NCX	Na ⁺ -Ca ²⁺ cserélő
Orai 1	kalcium felszabadulás által aktivált kalcium csatorna fehérje 1
PDE	foszfodiészteráz
PKA	protein kináz A
PKG	protein kináz G
PKC	protein kináz C
PLC	foszfolipáz C
ROC	receptor-vezérelt kalcium csatorna
RV	reziduális térfogat
SERCA	szarko-endoplazmatikus retikulum Ca ²⁺ -ATP-áz
SOC	raktár-vezérelt kalcium csatorna
SR	szarkoplazmatikus retikulum
Stim1	sztrómális interakciós molekula 1. altípusa
TLC	teljes tüdőkapacitás
TRPC6	transziens receptor potenciál kanonikus alesalád 6-os típus
VC	vitálkapacitás
VIP	vazoaktív intesztinális peptid
VEGF	vaszkuláris endotelialis növekedési faktor
VOC	feszültség-függő csatorna

2. Bevezetés

A drotaverin 1962 óta van jelen a magyar gyógyszerpiacon, elsődlegesen, mint görcsoldószer. Szerkezetében és hatásmódja tekintetében leginkább a mák papaverin alkaloidjára hasonlít, azonban a papaverinhez képest kedvezőbb farmakológiai tulajdonságokkal rendelkezik. Piacra kerülés időszakában főleg funkcionális tesztekkel jellemezték a gyógyszerjelölt molekulákat, tekintve, hogy a molekuláris hatásmechanizmusuk még csak korlátozottan volt ismert. A papaverin ciklikus-3',5'-nukleotid foszfodieszteráz (PDE) enzim gátló hatásának felfedezése után hamarosan kiderült, hogy a drotaverin is gátolja a foszfodieszteráz enzimeket és görcsoldó hatása valószínűsíthetően összefügg ezen intracelluláris mechanizmussal.

Csak 2002-ben derült ki, hogy a drotaverin mikromólos koncentráció tartományban gátolta mind a [(3)H] nitrendipin, mind pedig a [(3)H] diltiazem kötődését terhes patkány uterus membrán preparátumon. Egy anyag receptor kötődési tulajdonsága nem minden esetben vonja maga után a receptor funkcionális változását. Ezért a receptorkötési teszteket célszerű funkcionális vizsgálatokkal kiegészíteni. A drotaverin esetében receptorkötési tesztek mellett nem végeztek olyan vizsgálatokat, amelyekkel funkcionálisan is bizonyították volna a drotaverin L-típusú feszültség-függő Ca^{2+} -csatorna (L-VOCC)-blokkoló hatását. Munkám egyik célja annak bizonyítása volt, hogy a drotaverin funkcionálisan is gátolja az L-VOCC-t.

A drotaverin részletes PDE gátló hatásának tanulmányozása közben kiderült, hogy szelektíven gátolja a PDE IV enzimet, melynek elsődleges szerepet tulajdonítanak az asztma és az egyéb krónikus légúti megbetegedések patomechanizmusában. A Ca^{2+} szintén alapvető a légúti simaizom működés szempontjából, ezért kézenfekvőnek tűnt, hogy légúti simaizom preparátumon vizsgáljuk a drotaverin L-VOCC-blokkoló hatását és megállapítsuk, hogy a kapott funkcionális változások inkább L-VOCC-blokkoló, vagy PDE gátló hatásával vannak összefüggésben.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Légúti megbetegedések osztályozása

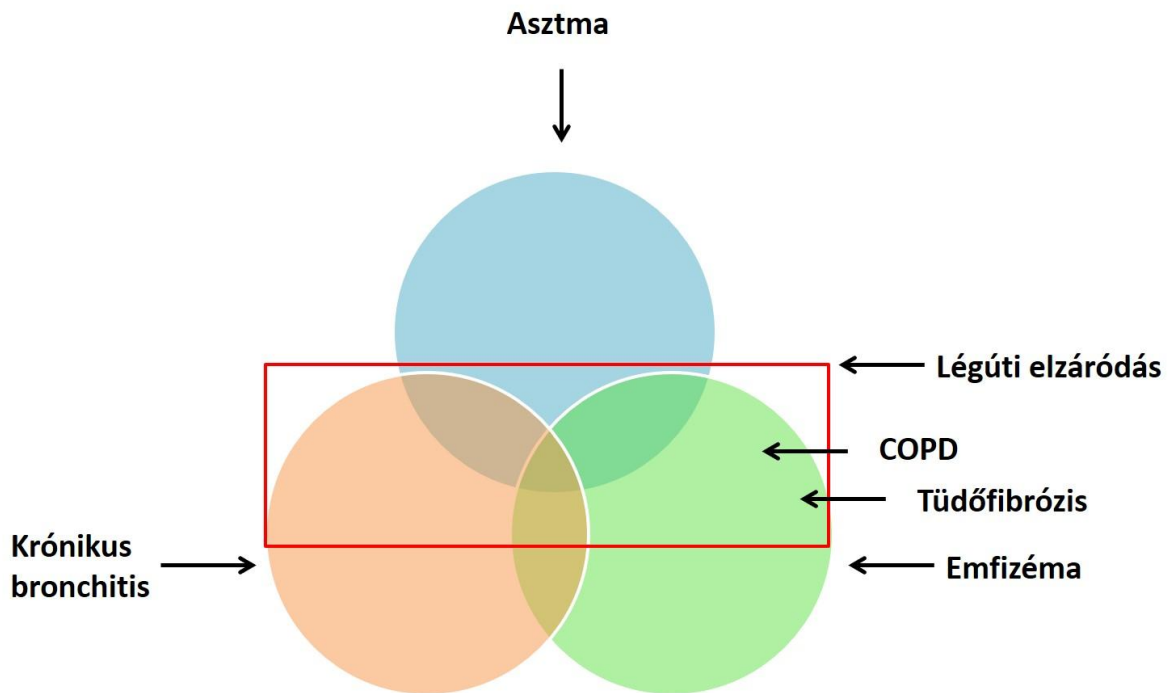
A nem fertőző ágens kiváltotta krónikus légúti betegségeket két nagy csoportra oszthatjuk. Obstruktív és restriktív tüdőbetegségekre, amelyek jellemzőit az **1. ábra** foglalja össze.

Obstruktív és restriktív megbetegedések

Obstruktív	Restriktív
<p><u>Jellemzője:</u> Csökkent VC, FEV1/FVC FEF 25-75% Fokozott TLC, RV, FRC</p> <ol style="list-style-type: none">1. COPD2. Asztma3. Bronchiektázia4. Cisztás fibrózis	<p><u>Jellemzője:</u> •Csökkent VC, TLC •Csökkent RV, FRC •Normális FEV1/FVC</p> <ol style="list-style-type: none">1. Pneumothorax2. Pleurális folyadékgyülem3. Melkasfal rendellenességei4. Neuromuszkuláris zavarok

1. ábra: Az obstruktív és restriktív megbetegedések jellemzői. TLC- teljes tüdőkapacitás, VC- vitálkapacitás, RV- reziduális térfogat, FRC- funkcionális reziduális kapacitás, FVC- erőltetett kilégzési vitálkapacitás, FEV 1- az első másodperc alatt kilégtetett levegő mennyisége, FEF- maximális kilégzési áramlás

Az obstruktív betegségek közé tartozik az asthma bronchiale (röviden asztma) és a krónikus elzáródásos tüdőbetegség a COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease). Mindkét betegség számtalan alcsoporttal és egymásba átmenetet képező megjelenési formával (fenotípus) rendelkezik. Kauppi és munkatársai 2011-ben a betegek által jelentett kimenetel és a retrospektív orvosi adatok alapján a betegeket három populációba sorolta: asztmában, COPD-ben, valamint asztmában és COPD-ben szenvedő átfedő tüneteket mutató betegek, amelyet a **2. ábra** szemléltet.



2. ábra: Az obstruktív légúti megbetegedések gyakran egymásba átmenetet képező megjelenési formával rendelkeznek.

Mindkét betegségre jellemző, hogy a tünetek nagy része összefüggésbe hozható az extracelluláris/intracelluláris Ca^{2+} ion egyensúlyt szabályozó folyamatok felbomlásával.

A restriktív tüdőbetegségek klasszikus példája a tüdőfibrosis, de ezekre a dolgozatomban nem térek ki.

3.1.1. Az obstruktív tüdőbetegségek epidemiológiája

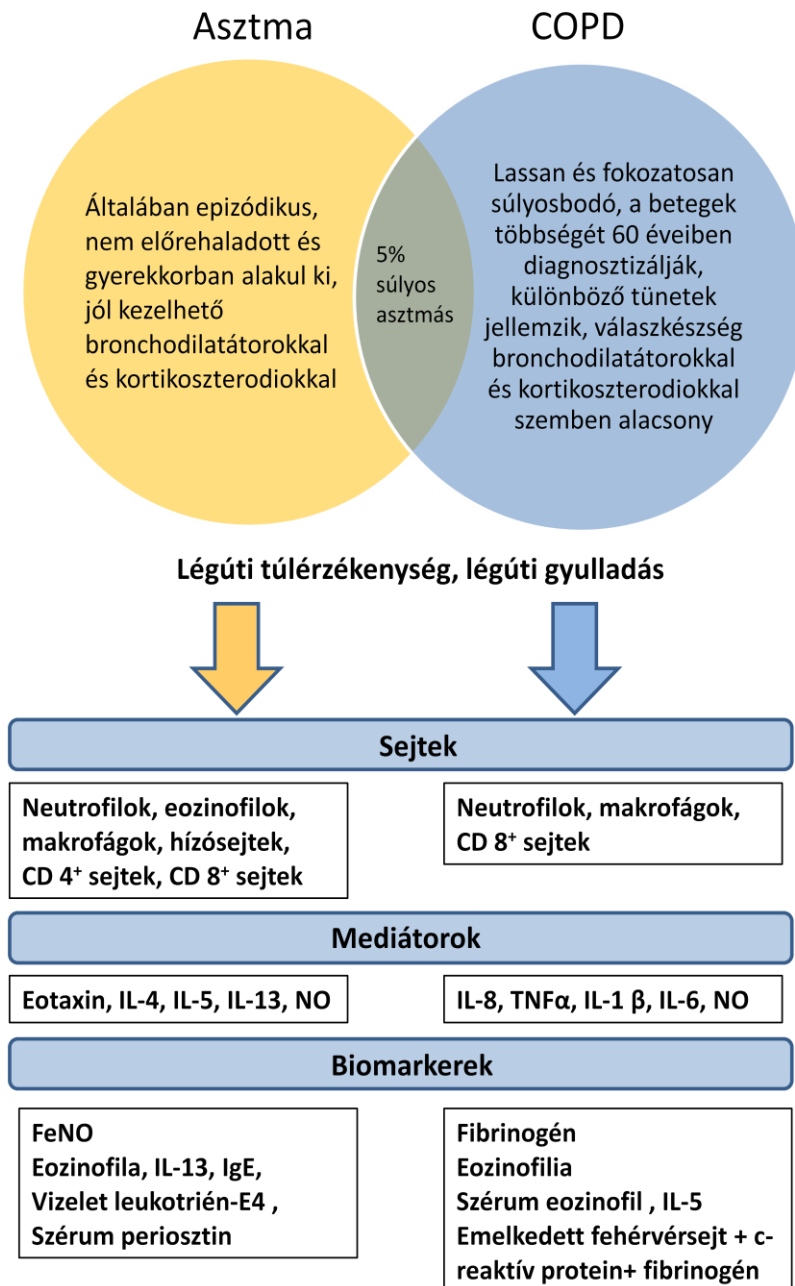
A WHO adatai alapján világszerte közel 300 millió ember szenved krónikus elzáródásos tüdőbetegségben. A 300 millió betegből kb. 235 millió ember szenved asztmában és körülbelül 64 millió COPD-ben. A levegőben keringő allergének, a növekvő légszennyezés, valamint a dohányzás évente 30 millió esetben súlyosítja a tüneteket. Az erőfeszítések ellenére a becslések azt mutatják, hogy együttesen 2030-ra az asztma és a COPD a 3. leggyakoribb halálozási tényező lesz. Magyarországra vonatkoztatva pontos epidemiológiai adatok nincsenek, de az Országos Egészségbiztosítási Pénztár elemzése szerint pulmonológiai szakellátó rendszerben nyilvántartott COPD-ben szenvedő betegek száma 2007-ben 109 999 volt, ugyanakkor a tényleges betegszám 400-500 ezerre tehető, ami a nyilvántartott létszám 4-5-szöröse (Csikós és Gajdácsi, 2011^a). Az asztmában szenvedő

felnőtt betegek száma 2006-ban 209103, de évente mintegy 10-18 ezer új beteget diagnosztizálnak (Csikós és Gajdácsi, 2011^b).

3.1.2. Az asztma és a COPD tünetei, kóroka

Az elzáródásos tüdőbetegségek leggyakoribb tünetei közé tartozik a túlérzékenység következtében kialakuló tüdő légcsere csökkenése, nehézlégzés, fulladás, krónikus köhögés, amelyek hátterében a légcső átmérőjének visszafordítható (légúti simaizom válasz) és állandó (remodelling) elváltozásai (emfizéma, bulba, nyáksejt túlszaporulat/túlműködés) állnak. Huber már több mint 90 évvel ezelőtt asztmás betegekben megfigyelte, hogy az állandó (perzisztens) változások a megváltozott légcső szerkezet következményei (Huber és mtsai, 1922). A légcső szubepitél, illetve simaizom rétegének megvastagodása következtében csökken annak belső átmérője, a fala ez által vastagabbá és rugalmatlanabbá válik. A felszaporodott simaizom mennyiség pedig fokozott kontrakciós választ, így légúti szűkületet idéz elő. Szélsőséges esetben a simaizom összehúzódást kiváltó anyagok hatására a légút teljesen összeszűkül, elzáródás alakul ki. A fokozott és sűrű nyáktermelés szintén szűkíti, extrém esetben el is zárja a légutakat. A légcsőben a levegő áramlási sebessége a légcső átmérőjének harmadik hatványával arányosan változik. Ez azt jelenti, hogy kismértékű átmérő változás nagymértékű áramlásvaltozással jár. Későbbi tanulmányok bizonyították, hogy nem csak a légúti simaizom megvastagodása áll emögött, hanem a variábilis tényezők, mint például az allergének és a gyulladás következtében kialakuló kontrakció fokozódás is. Annak ellenére, hogy csak időleges légáram csökkenést okoznak a fent említett tényezők, mégis szerepet játszanak az asztma és a COPD patológiájában.

Bár mind az asthma bronchiale mind a COPD az elzáródásos légúti megbetegedések csoportjába tartozik, a két betegség kórokiilag jelentősen különbözik, amelyet a **3. ábrán** bemutatott eltérő biomarkerek és mediátorok is mutatnak.



3. ábra: Az asztma és COPD közötti hasonlóságok és különbségek. Az ábrát Barnes, 2006 alapján készítettem.

3.1.3. Kezelési lehetőségek

Az asztmára jellemző, hogy az időben változó mértékű hörgőszűkület az esetek nagy részében az **1. A táblázatban** felsorolt hörgőtágító szerekkel, mint például az adrenerg-béta₂-receptor (ADRB₂) agonista vegyületek alkalmazásával rövid időn belül visszafordítható. Az asztma, a szteroid-rezistens asztma kivételével, jól reagál a gyulladáscsökkentő glükokortikoid kezelésre is. Az asztma elsődlegesen simaizom eredetű légúti szűkületével szemben a COPD

háttérben főként a gyulladás okozta szöveti károsodás áll. Ebben a folyamatban kulcsszerepet játszanak a neutrofilok és a makrofágokból felszabaduló gyulladásos mediátorok, amelyek szekréciója a PDE IV enzim gátló szerekkel megakadályozható. A roflumilast szelektív PDE IV gátló, ezáltal hatékonyan gátolja a tüdőszöveti gyulladást, valamint a tüdő fibrotikus és enzímás átépülését. Bár a COPD-ben is kimutatható hörgő szűkület, de az általában konstans mértékű és béta₂ (β₂) agonistákra kevésbé reagál. A COPD nagyrészt szteroid rezistens betegség, a kezelési lehetőségeit a **1. B táblázatban** összegeztem.

1.A. táblázat: Asztmában használt gyógyszerek és egyéb terápiák. A táblázatot Shahidi és FitzGerald, 2010 alapján készítettem.

Asztma		
Fenntartó terápiához használt szerek	Tüneti szerek	Egyéb
Inhalációs glükokortikoszteroidok	Gyors hatású inhalációs β ₂ -agonisták	Orális antiallergén szerek
antileukotriének	Szisztémás glükokortikoszteroidok	Allergén-specifikus immunterápia
hosszú hatású β ₂ -agonisták	Antikolinerg szerek	
anti-IgE		
Szisztémás glükokortikoszteroidok		

1.B. táblázat: A COPD kezelésére használt gyógyszerek és egyéb terápiák. A táblázatot Vestbo, 2013 alapján készítettem.

COPD		
Fenntartó terápiához használt szerek	Tüneti szerek	Egyéb
Antikolinerg szerek	Gyors hatású inhalációs β ₂ -agonisták	Antibiotikumok
Inhalációs glükokortikoszteroidok	Szisztémás glükokortikoszteroidok	Mukolitikumok
hosszú hatású β ₂ -agonisták	Antikolinerg szerek	Oxigén kezelés
β ₂ -agonisták és glükokortikoszteroidok kombinációja	Teofillin	Antioxidánsok
Aminofillin, Teofillin	Roflumilast	

3.2.Tengerimalac, mint asztma és COPD modell

A tengerimalac a leggyakrabban használt állat a kisméretű állatfajok közül az asztma és COPD preklinikai vizsgálataihoz (Canning, 2003). Számos alapvető folyamatot, mediátort és légúti megbetegedések pathogenezisében szerepet játszó regulátort fedeztek fel, illetve demonstráltak elsőként tengerimalacokban, beleértve a Schulz-Dale hiperszenzitivitás reakciót (Dale, 1913), a hisztamin szerepét (Brocklehurst, 1960), a ciszteinil-leukotriéneket (Snyder és Krell, 1984), β -adrenoceptor szubtypusokat (Hartley és mtsai, 1968), tromboxánt (Bureau és mtsai,1992), vaszkuláris endoteliális növekedési faktort (VEGF) (Connolly és mtsai, 1989), eotaxint (Jose és mtsai 1994), alveolaris makrofágok neutrofil kemotaktikus faktorait (Hunninghake és mtsai, 1978) (leukotriének B₄ és/vagy IL-8) és a cAMP (Robison és mtsai, 1968) valamint az inozitol-trifoszfát szerepét a szignál transzdukcióban (Burgess és mtsaim 1984). A tengerimalacok receptor morfológiája sokkal közelebb áll a humán receptor morfológiához, mint más gyakran használt fajoké (Muccitelli és mtsai,1987; Canning, 2003; Ressimyer és mtsai, 2006). Több tüdő mechanika mérésére szolgáló módszert fejlesztettek ki olyan vizsgálatokban, amelyekben tengerimalacot használtak modell állatként (Amdur és Mead, 1958; Pennock és mtsai, 1987). Ennek ellenére az elmúlt években a transzgénikus egértörzsek megjelenésével csökken a tengerimalacok használata a légúti megbetegedések modellezésére, ami azért is sajnálatos mivel számos végpontot jobban modellez, mint az egér az asztmához és COPD-hez kapcsolódóan (Persson és mtsai 1997; Persson, 2002, Meurs és mtsai, 2006;).

3.2.1. A tengerimalac légutak autonómiája és fiziológiája

A tengerimalac légzőrendszerének a fiziológiája hasonló az emberéhez, amelyet számos tanulmány bizonyított (Hughes, 1965; Dalen, 1983; Muccitelli és mtsai, 1987; Ressimyer és mtsai, 2006). Többrétegű epitélium borítja a tracheát, a főhörgőket és a nagy intrapulmonáris bronchusokat mind a két fajban (Dalen, 1983). A vagális afferens idegek, beleértve a C-típusú idegrosotokat és a mechanoreceptorokat, beidegzik az epitéliumot és a szubepitéliális teret (Canning és mtsai, 2006). A szubepitéliális vaszkulatura az epitélium és a simaizom réteg között helyezkedik el (Hughes, 1965; Miodonski és mtsai, 1980). Ezek a vonások megtalálhatóak mind az emberben, mind a tengerimalacban, viszont az egerekben eltérőek, mivel bennük hiányzik a szubepitéliális vaszkulatura és csak kevés nyálmirigyük van és ritkán beidegzett az epitéliumuk (Pack és mtsai, 1984; Choi és mtsai 2000;

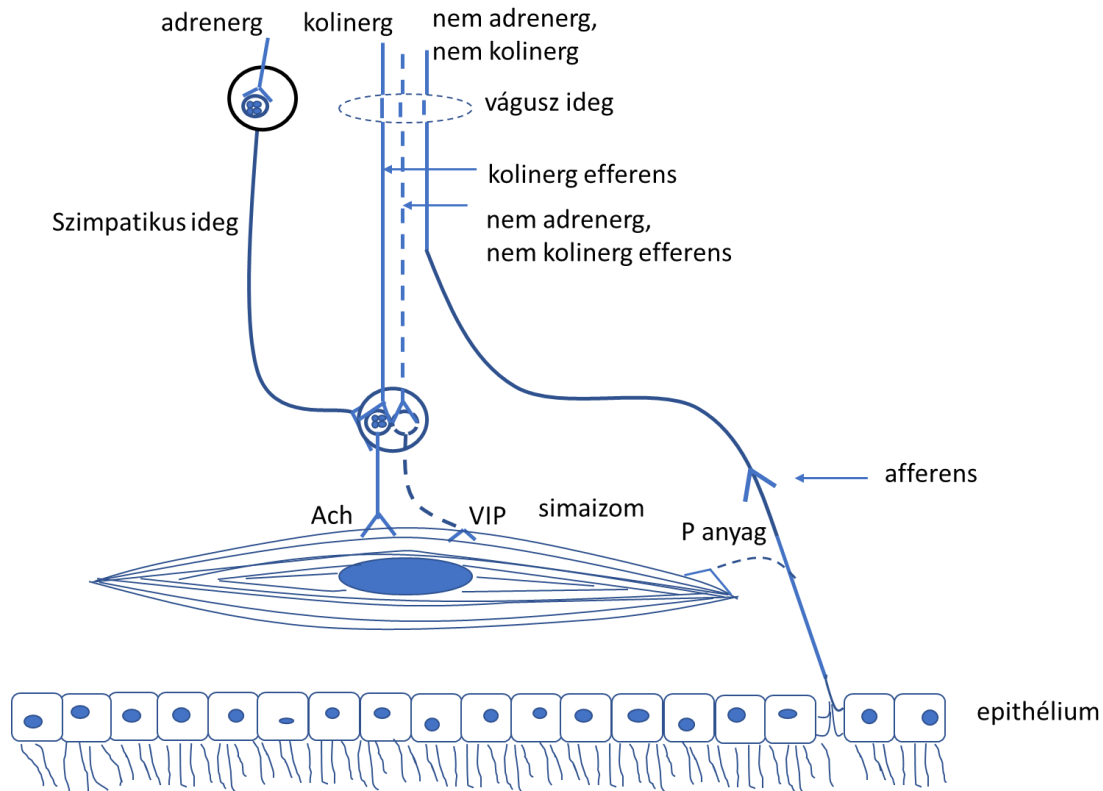
Widdicombe és mtsai, 2001). A neuroendokrin sejtek és a neuroepiteliális testek mind az emberekben, mind a tengerimalacokban az epitéliumban helyezkednek el (Adriaensen és mtsai, 2006). A légúti simaizom a tengerimalacokban mind anatómiailag, mind funkcionálisan hasonló az emberi légutakban található simaizomhoz, azaz végighalad a tracheától a terminális bronchusokig. A tracheában és az extralobáris bronchusokban a rugalmas patkó alakú hialin porcgyűrűket kapcsolja össze, míg az intralobáris bronchusokban ettől eltérően a simaizom egy folyamatos réteget képez a bronchusok falában, amíg a porc nem képez folyamatos struktúrát és teljesen hiányzik a perifériás bronchusokból (Brendan és mtsai, 2008).

Szintén jellemző mind a két fajra, hogy az izolált légúti simaizom egy spontán tónust mutat, amelynek kiváltásához a lokálisan felszabaduló autakoidok járulnak hozzá. Az emberi légutakban ez a bazális tónus a hízósejtekből felszabaduló hisztaminnak és a cisztenil-leukotriéneknek tulajdonítható (Ellis és Undem, 1994). A tengerimalacokban ezt a bazális tónust szabályozza a prosztaglandin E_2 , a ciklooxygenáz-2 aktivitáson keresztül (Orehek és mtsai, 1975), amely nem szteroid típusú ciklooxygenáz gátló indometacin alkalmazásával megakadályozható (Charette és mtsai, 1995). Emberekben is megtalálható a ciklooxygenáz aktivitás, de valószínűleg hiányoznak az EP_1 receptorok a simaizomból, amelyek a tengerimalacokban a bazális tónus szabályozásáért felelősek (Ndukwu és mtsai, 1997), viszont az autakoidok mind két fajban hatással vannak a bazális tónusra, amely bizonyítható mind *in vivo*, mind *in vitro* (Impens és mtsai, 1993).

3.2.2. Tengerimalac légutainak beidegzése

A tengerimalac légúti simaizmának autonóm beidegzése nagyon közel áll az emberéhez (Canning, 2006). A paraszimpatikus idegrendszer képezi a fő bronchokonstriktív neuronális útvonalat a légutakban (Nazinigouba és mtsai, 2014), a kolinerg beidegzés felelős a légutak bazális tónusáért (Widdicombe, 1963). A kolinerg rostok a bolygóidegen keresztül haladnak lefelé, majd a légutak falában lévő paraszimpatikus ganglionokba csatlakoznak, amelyet a **4. ábra** mutat. A paraszimpatikus ganglionok sűrűsége a proximális légutakban éri el a maximumát, körülbelül az 5-7. bronchus sorban (Daniel és mtsai, 1986). Ezekről a ganglionokról kezdődően a rövid posztszinaptikus rostok elérik a simaizmot és a nyálmirigyeket (Coburn, 1987). Az acetilkolin (ACh), a fő neurotranszmittere a paraszimpatikus idegrendszernek, amely felszabadul mind a ganglionos szinapszisokból,

mind a posztganglionos idegvégződésekből a depolarizáció következtében az L-VOCC csatornákon beáramló Ca^{2+} hatására (Giovannini és mtsai, 2002).



4. ábra: Az autonóm idegrendszer adrenerg, kolinerg, nem-adrenerg és nem-kolinerg komponensei. Az ábrát Barnes, 1984 alapján készítettem.

A ganglionokban, az Ach hat a posztszinaptikus nikotinos kolinoreceptorokra, amelyek felelősek az ingerületátvitelért és az M2 (muszkarin) receptorokra, amelyek a negatív visszacsatolásban vesznek részt. A neuromuszkuláris idegvégzésekben az ACh aktiválja a az M3 receptorokat, amelyek felelősek a kontrakcióért, valamint az M2 receptorokat, amelyek részt vesznek az Ach felszabadulás negatív szabályozásában (Roux és mtsai, 1998).

Szemben a kolinerg stimulációval, az adrenerg stimuláció (4. ábra) relaxálja a légutakat annak ellenére, hogy az adrenerg beidegzés a légúti simaizomban gyengébb az emberekben, a β_2 -adrenoreceptorok nagy mennyiségben vannak jelen a légúti simaizomban (Pack és Richardson, 1984). Azok az adrenerg rostok, amelyek a paraszimpatikus ganglionokban haladnak, lehetővé teszik a légúti simaizmok indirekt adrenerg kontrollját (Daniel és mtsai 1986).

Az Ach és a noradrenalinon kívül, az autonóm idegrendszer nem-adrenerg és nem-kolinerg (NANC) komponense képes más kontraktilis és relaxációs agonisták felszabadítására, mint például a neuropeptid Y, P anyag, neurokininek, vagy vazóaktív intesztinális peptid (VIP). Mivel a NANC rendszer nem olyan kifejezett az emberi légutakban, csak alacsony funkcionális szabályozó hatása van (Jarti, 2001).

Az autonóm idegrendszeren felül, számos sejttípus található a légutak falában, mint az epitél sejtek, gyulladásozó sejtek és a miociták, amelyek különböző mediátorok felszabadítására képesek, mint például az endotelin (ET), adenosin-5'-trifoszfát (ATP), arachidonsav metabolitjai és hisztamin (FitzPatrick és mtsai 2014). A hisztamin a hízósejtek és a bazofil sejtek granulumaiban raktározódik, de felszabadulva a simaizomsejtek H₁R (Hisztamin 1 receptor) receptorain keresztül közvetlenül képes bronchokonstriktiót kiváltani, a H₃ (Hisztamin 3 receptor) receptoron keresztül, ugyanakkor viszont képes hatni a kolinerg ingerület átvitelre mind a paraszimpatikus ganglionokon, mind a posztganglionáris idegrostokon (Ichinose és Barnes, 1989).

3.2.3. Szignáltranszdukció tengerimalacokban és embereken

A légúti simaizom sejtek és a gyulladásozó sejtek szignáltranszdukciója nagyon hasonló embereken és tengerimalacokban (Chabot és mtsai, 1995; Billington és Penn, 2003). A simaizom összehúzódásért az intracelluláris Ca²⁺ szint megnövekedés, valamint inozitol foszfát (IP) útvonal felelős (Salari és mtsai, 1992, Preuss és Goldie, 1999). A kontrakciós agonisták a G-fehérje kapcsolt receptoron G_q-fehérjén hatnak, amely mind a két faj légúti simaizmában megtalálható, és funkciója bizonyított (Billington és Penn, 2003). Ellenben, néhány azon agonisták közül, amelyek a G_i-fehérjéhez kötődik, az aktiválódást követően gátolja az adenilát-cikláz aktivitást, (Pyne és mtsai, 1992; Roffel és mtsai, 1993) relaxációt eredményezve. Ezek az agonisták mind a két fajban a ciklikus nukleotidok, a cAMP és cGMP-t, valamint a Ca²⁺ aktivált K⁺ csatornákon keresztül hatnak (Corompt és mtsai, 1998). A ciklikus nukleotidokat ezt követően inaktiválhatja számos foszfodieszteráz izoenzim, mint a PDE III, PDE IV és PDE V-t, amelyeket azonosították mind az emberi, mind a tengerimalac légúti simaizomban (Torphy, 1998).

3.2.4. Membránpotenciál tengerimalacokban és az emberben

A légúti simaizom sejtek nyugalmi membránpotenciálja -60 és -45 mV között van (Tomita, 1989). A legtöbb fajban, mint például a tehénben és a kutyában stabil, de ezzel szemben emberekben és a tengerimalacokban oszcillál, amelyet „lassú hullámoknak” neveznek. Ezt a jelenséget elsőként tengerimalac légcső simaizom sejtekben figyelték meg (Small, 1982), majd később bebizonyosodott, hogy ez a jelenség szintén megfigyelhető az emberi légcső (Honda és Tomita, 1987) és bronchusok simaizmaiban is (Ito és mtsai, 1989). A „lassú hullámok” átlagos amplitúdója és frekvenciája amíg tengerimalacokban 12 mV és 50 hullám min^{-1} , az átlagos membránpotenciál -50 mV, emberekben ez az érték egy kicsit alacsonyabb (8 mV, 20 lassú hullám min^{-1} és -45 az átlagos membrán potenciál értéke) (Tomita, 1989).

Továbbá az *in vitro* kísérletekben azt is megfigyelték, hogy mind a tengerimalac, mind az ember légutak spontán tónust mutatnak. A tengerimalac esetében ennek oka a folyamatosan termelődő és felszabaduló prosztaglandinok, (Raeburn és mtsai, 1987) amelyeket a ciklooxygenáz-2 (COX-2) szabályoz (Charette és mtsai, 1995). Ezzel szemben az emberekben a spontán tónusért a hisztamin és a leukotriének felszabadulása, (Ellis és Undem, 1994) valamint a ciklooxygenáz metabolitok és a légúti epitélium felelős (Watson és mtsai, 1997). A COX-2 hatékony inhibitora az indometacin, amely mikromólos koncentrációban képes megakadályozni a prosztaglandin termelődést tengerimalac légcső preparátumon (Hiramatsu és mtsai, 2010).

Annak ellenére, hogy a tengerimalac és az emberi légúti simaizom „lassú hullámokat” bocsájt ki, ezek csak igen ritkán alakulnak akciós potenciálokká és a légúti simaizom membránja általában egy erős kifelé irányuló rektifikációt mutat (ionáramlás kifelé kedvezményezett) (Tomita, 1989). Ez a kifelé irányuló rektifikáció azt jelenti, hogy minden egyes depolarizációs próbálkozást azonnali K^+ csatornák nyitása követ, fokozva a K^+ effluxot, amely hiperpolarizálja a membránt, így próbálva egyensúlyozni a depolarizációt. Eddig összesen 14 különböző K^+ csatornát azonosítottak, (Alexander és Peters, 1999) de a légúti simaizom membránjában ezek közül csak néhány található meg. Ide tartozik a nagy vezetőképességű Ca^{2+} aktivált K^+ csatorna (BK_{Ca}) és a késleltett rektifikációjú K^+ csatorna (K_v), amelyek felelősek a légúti simaizom erős kifelé irányuló rektifikációjáért (Murray és mtsai, 1991). A BK_{Ca} csatorna feszültség és Ca^{2+} érzékeny K^+ csatorna, amely az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növekedésre és a membrán depolarizációra aktiválódik

(Kotlikoff, 1993). Ennek ellenére úgy tűnik, hogy a G-fehérjék és a intracelluláris másodlagos hírvivők is képesek szabályozni a működését a kontrakció-relaxáció során. Ezzel szemben a K_v csatornát egyedül a magas (20mV) membrán depolarizáció aktiválja (Kotlikoff, 1993).

3.3. Légúti simaizom tónusának szabályozása

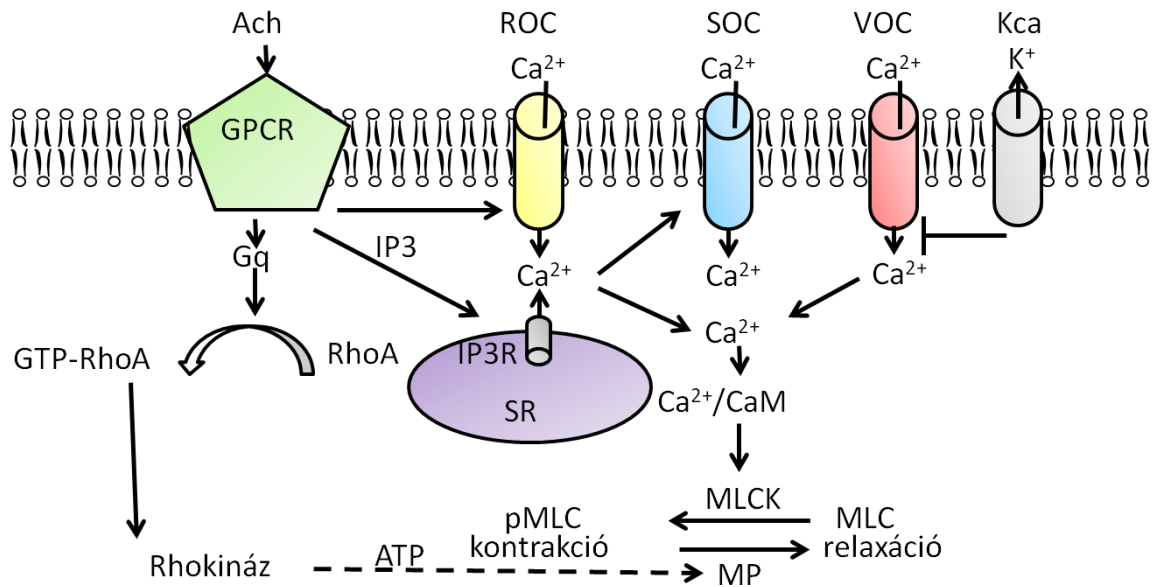
3.3.1. Ca^{2+} szerepe a légúti simaizom tónusának szabályozásában

A légúti simaizom kontrakciót képes kiváltani a depolarizáció (elektro-mechanikai kapcsolat), vagy kontraktilis agonsitákkal való stimuláció (farmako-mechanikai kapcsolat). Mind a két útvonal közös jellemzője, hogy intracelluláris szabad Ca^{2+} koncentráció növekedést okoz $(Ca^{2+})_i$. Normál fiziológias körülmények között az extracelluláris Ca^{2+} koncentráció 1-2 mM, míg a $(Ca^{2+})_i$ a nyugalomban lévő simaizom sejtben körülbelül 150 nM (Murray RK, Kotlikoff, 1991). Ez a koncentráció különbség 4 nagyságrendnyi, amely biztosítja a megfelelő grádiens. Nyugalomban csak nagyon kevés Ca^{2+} ion lép be a sejtbe, ami miatt a $(Ca^{2+})_i$ koncentráció viszonylag konstans, köszönhetően a különböző homeosztázis fenntartásáért felelős mechanizmusoknak. Ide tartozik a Na^+/Ca^{2+} csere transzporter, amelyet a befelé irányuló Na^+ gradiens irányít, valamint a Mg^{2+} függő plazmamembrán $Ca^+-H^+-ATPáz$ (Barnes, 1992) és a szarkoplazmatikus retikulumban található $Ca^{2+}-ATPáz$ (Somlyó és Somlyó, 1994). A légúti simaizom ingerlését követően a $(Ca^{2+})_i$ hirtelen megemelkedik körülbelül 800 nM-ra, amely sikeres ingerlés esetén (45-60 sec) 300 nM körül tartja fennt a $(Ca^{2+})_i$ -ot (Murray és Kotlikoff, 1991). A kezdeti $(Ca^{2+})_i$ növekedés konformációváltozást okoz a Ca^{2+} -kalmodulin komplexben, amely aktiválja a miozin könnyűlanc kinázt (MLCK). A MLCK felelős a 20 kDa méretű miozin könnyűlanc foszforilációjáért (MLC_{20}), amely ez által aktiválja a miozin ATP-ázt és kereszthidak képződését az aktin és a miozin között. A citoszolban lévő Ca^{2+} egy részét a szarko-endoplazmatikus retikulum $Ca^{2+}-ATPáz$ visszapumpálja a szarkoplazmatikus retikulumba (SR), illetve a légúti simaizom sejt membránjában lévő plazma membrán $Ca^{2+}-ATPáz$ kipumpálja a sejtéből. A csökkenő Ca^{2+} szint hatására a MLC_{20} -t defoszforilálja a miozin könnyűlanc foszfátáz (MLCP) és a kontrakciót relaxáció váltja fel.

3.3.2. A farmako-mechanikai kapcsolat

Az egyensúlyban lévő nyugalmi Ca^{2+} koncentrációt megváltoztatják a kontraktilis agonisták G-fehérjékhez kapcsolt receptorokhoz való kötődése. A kötődést követően a G_q -fehérje aktiválja a foszfolipáz C-t (PLC), és ez hasítja a membránhoz kötött foszfatidil

inozitol-4-5-biszfoszfátot inozitol-1,4,5-trifoszfáttá (IP₃) és diacil-glicerollá (DAG). A felszabaduló IP₃ a szarkoplazmatikus retikulumból gyors (Ca²⁺)_i felszabadulást vált ki, amellyel elkezdődik a kontrakció kezdeti szakasza, amit az **5. ábra** mutat. A Ca²⁺ felszabadulás további Ca²⁺ influxot vált ki a raktár vezérelt csatornákon keresztül (SOC) (Ito és mtsai, 2002). Kimutatták, hogy a felszabaduló DAG-nak szerepe van a protein kináz C-n (PKC) keresztüli kontrakció fenntartásában (Somlyó és Somlyó, 1994). A dihidropridin-érzékeny feszültség függő kalcium csatornákon (VOC) keresztüli influx is hozzájárul a G-fehérjéhez kapcsolt receptor (GPCR) kiváltotta (Ca²⁺)_i emelkedéshez (Kume és mtsai, 2003). A Ca²⁺ hatására aktiválódnak a Ca²⁺ érzékeny Cl⁻ csatornák (CLCA) (Liu és Farley, 1996), amely depolarizálják a légúti simaizomsejt membránját és aktiválja a VOC-t, amely további Ca²⁺ influxhoz vezet (**5. ábra**). Ennek ellenére a szerepe valószínűleg jelentősebb az intracelluláris Ca²⁺ raktárak újratöltésében (Bourreau és mtsai, 1991) és az elektro-mechanikai kapcsolat során kiváltott kontrakcióban. A GPCR-kiváltotta légúti simaizom kontrakció kezdeti szakaszát egy tartósan fennmaradó magas (Ca²⁺)_i koncentráció követ, amely fenntartásáért valószínűleg a receptor vezérelt csatornák (ROC) felelősek (Murray és Kotlikoff, 1991). A (Ca²⁺)_i emelkedés aktiválja a BK_{Ca} csatornákat, amelyek a membrán hiperpolarizációján keresztül ellensúlyozzák az agonista kiváltotta kontrakciót, de G-fehérje kapcsolódása a BK_{Ca} csatornákhöz igyekszik ezt a folyamatot elnyomni (Kume és mtsai, 1995). Másfelől a kontraktilis agonisták aktiválta GPCR közvetíti az RhoA stimulációját (Hart és mtsai, 1998). Az RhoA-t a GTP kötődése aktiválja, ami aktiválja az Rho kinázt, ami foszforilálással inaktiválja a MP-t (Kimura és mtsai, 1996), így az nem képes csökkenteni a MLC foszforiláltságát és relaxációt okozni, amely általa kontrakció Ca²⁺-tól függetlenül is fokozódhat.



5. ábra: A Ca^{2+} szerepe a simaizom tónusának szabályozásában. Az MLC foszforilációja, amelyet a MLCK és a MP működése közti egyensúly szabályoz, felelős a légúti simaizom tónus szabályozásáért. Agonista kötődés hatására ROC-on és az IP3R-en keresztül megemelkedik a (Ca^{2+})_i szint. Ennek következtében csökken az SR Ca^{2+} koncentrációja, így aktiválódik a SOC keresztüli Ca^{2+} influx, hogy pótolja a Ca^{2+} csökkenését. Ezek a folyamatok összességében fokozzák a Ca^{2+} kalmodulinhoz való kötődését, így létrehozva a Ca^{2+} -kalmodulin komplexet. A Ca^{2+} -kalmodulin komplex fokozza a MLCK aktiválását, ami a MLC foszforilálásához vezet. Az emelkedő Ca^{2+} hatására aktiválódnak a K_{ca} csatornák, amelyek a sejtmembránt hiperpolarizálva gátolják a VOC csatornán keresztüli Ca^{2+} influxot. Más felől a kontraktilis agonisták a GPCR-en keresztül aktiválják az RhoA-t, amely elősegíti a MP foszforilációját, amely a csökkenő Ca^{2+} szinttel relaxációhoz vezet. Az ábrát Kume, 2015 Figure 1 alapján készítettem.

3.3.3. Elektro-mechanikai kapcsolás

Az agonisták képesek depolarizációt kiváltani a nem szelektív kation csatornák aktivációjával (Pacaud és Bolton, 1991) és a K^+ csatornák gátlásával és/vagy Cl^- csatornák aktivációjával (Kremer és mtsai, 1989; Pacaud és mtsai, 1991), így nyitva az L-VOCC-t. Kimutatták, hogy az agonisták képesek membrán depolarizáció nélkül is a csatornák nyitására direkt, vagy indirekt hatást gyakorolva a GTP kötő fehérjére (Nelson és mtsai, 1988). A csatorna a folyamatos depolarizáció hatására érzéketlenné válik, bár a K^+ indukálta depolarizáció hatására folyamatosan növekedik az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció és a kontrakció folyamatosan fennmarad. Az elektrofiziológiai kutatások során kiderült, hogy a depolarizáció következtében beáramló Ca^{2+} a maximumát 10 ms után éri el, majd utána nem marad fent, hanem alacsony szintre esik vissza. Ezt az alacsony befelé irányuló Ca^{2+} áramot

úgy is nevezik, mint „nem aktiváló” áram, amely azért szükséges, hogy az intracelluláris Ca^{2+} növekedés folyamatos legyen (Imaizumi és mtsai, 1991; Fleischmann és mtsai, 1994).

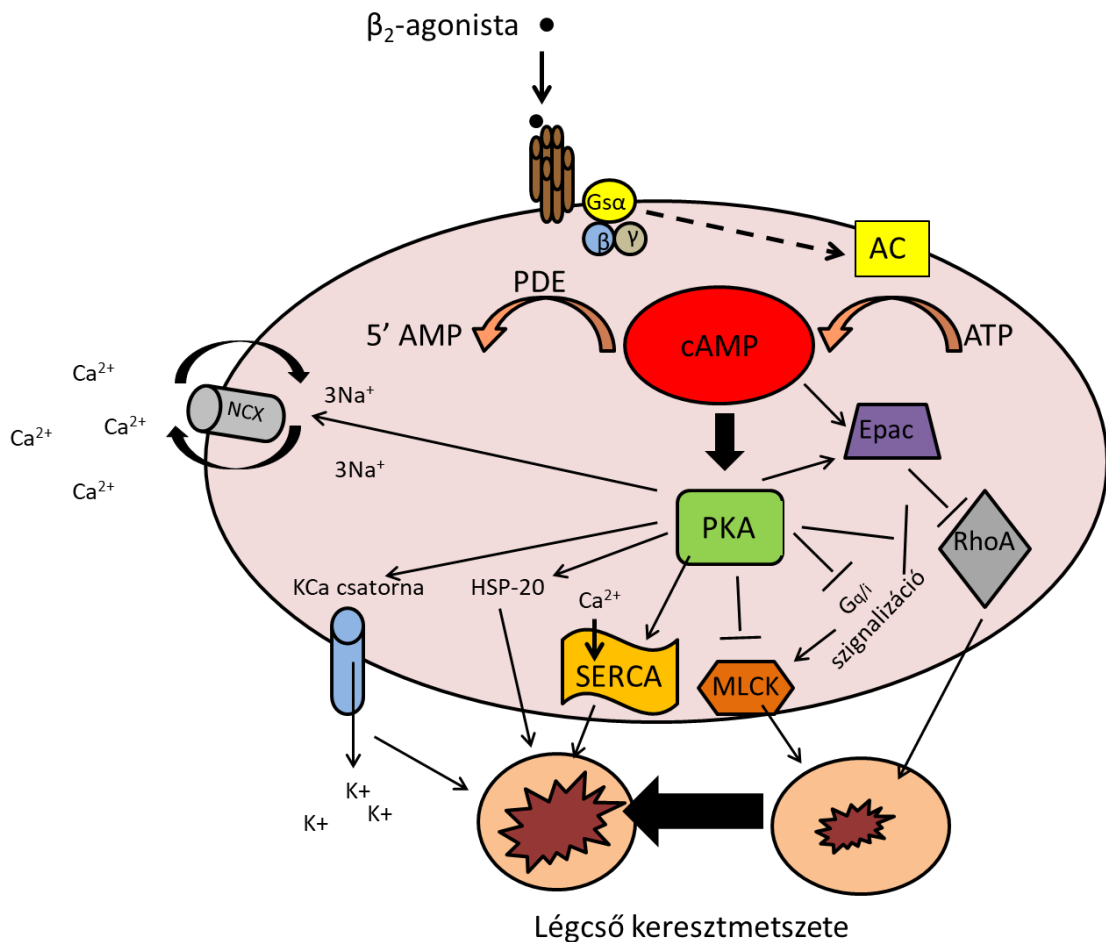
Az SR Ca^{2+} tartalmának csökkenése gátolja a Ca^{2+} aktivált K^+ csatornákat, így depolarizációt okoz (Karakí és mtsai, 1997). Ez a folyamat képes kiváltani az L-VOCC-n keresztüli Ca^{2+} influxot, így fokozva a simaizom tónust (Kojima és mtsai, 1994). Bourrau és munkatársai kutya tracheával végzett kísérlet során azt találták, hogy az L-VOCC-nek szerepe van a SR-újratöltődésében. Ezt támasztja alá az is, hogy az SR Ca^{2+} pumpáinak a gátlása depolarizálja a sejt membránt és fokozza az $(\text{Ca}^{2+})_i$ -t (Sekiguchi és mtsai, 1996).

A β -adrenoceptorok is képesek az L-VOCC aktiválására (Welling és mtsai, 1992; Muraki és mtsai, 1993), de ennek ellenére mégis relaxációt okoznak kontrakció helyett. Ezt az ellentmondást a cAMP növekedésével magyarázzák.

3.4. A cAMP szerepe a légúti simaizom tónus szabályozásában

A cAMP egy klasszikus másodlagos hírvivő molekula, amelyet Rall és Sutherland fedezett fel májkivonatból izolálva (Rall és Sutherland, 1958). Hatása nagyon komplex, számos szignalizációs útvonalra hatással van, mind önmagában, mind effektor molekulákon keresztül. Szerepe kulcsfontosságú a légúti simaizom tónus szabályozásában, mivel közvetíti a GPCR által kiváltott légúti simaizom relaxációt (Penn, 2008), de hatással van a gyulladáshoz vezető mediátorok kiválasztásában és extracelluláris mátrix termelésében, valamint az epitél sejtek proliferációjában, migrációjában és a mucos termelésben (Salathe, 2002). A légúti simaizom sejtekben a cAMP koncentrációjának a növekedése lejátszódhat a lebontásáért felelős PDE enzimek gátlása révén, de a leggyakrabban tanulmányozott útvonal a β_2 -adrenoceptor agonisták kötődése révén aktivált AC, amely ATP-t használ cAMP szintézisére. A folyamatot a **6. ábra** mutatja be. A cAMP szintjének a növekedését követően két cAMP molekula kötődik a PKA regulációs alegységéhez lehetővé téve a katalitikus alegység aktiválását. A PKA számos célpontot foszforilál, amelyek, vagy az $(\text{Ca}^{2+})_i$ -ot, vagy a légúti simaizom Ca^{2+} érzékenységét csökkentik, ezáltal csökken a MLC foszforiláltsága, ami végül a simaizom ellazulásához vezet. A PKA foszforilálja a nagy vezetőképességű Ca^{2+} aktivált K^+ csatornákat (Kume és mtsai, 1989), köztük a K_{ca} csatornát (Kume és mtsai, 1994). A K_{ca} csatornák nagy számban vannak jelen a légúti simaizomsejt membránján és szabályozzák a tónust. A K_{ca} csatornák aktiválása a membrán hiperpolarizálásához vezet, amely elősegíti a L-VOCC csatornák zárását, így csökkentve az $(\text{Ca}^{2+})_i$ szintet, amely relaxációhoz vezet. A PKA további

célpontja a HSP₂₀, amely az F aktin depolimerizáción keresztül okoz relaxációt (Mariam és mtsai, 2009), valamint az Epac, amelyre a cAMP közvetlenül is hat, így csökkentve a MLC foszforiláltságát és az RhoA-n keresztüli MP-t inaktiválást (Billington és mtsai 2013). Kimutatták, hogy a cAMP szintet emelő ágensek, vagy a β_2 -receptor agonisták hatással vannak az intracellularis Ca^{2+} eltávolításra is a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cserélőn (NCX) keresztül (Yamanaka és mtsai, 2003). A PKA befolyásolja a G_q szignalizációs útvonalat, gátolja a G_q -kapcsolt receptorokat, így gátolva a PLC indukálta Ca^{2+} felszabadulást az SR-ből (Billington és mtsai 2013). Egyik fő célmolekulája a foszfolamban, amely az SR Ca^{2+} -ATP-áz (SERCA) Ca^{2+} felvételét szabályozza és foszforilált állapotban fokozza a Ca^{2+} felvételt (Billington és mtsai, 2013).



6. ábra: A β_2 -receptor agonista AC aktiválásán keresztül megnövelt cAMP koncentráció kiváltotta PKA szignalizációs útvonalak. A PKA a K_{ca} csatornák foszforilálásán és a SERCA Ca^{2+} felvételének fokozásán keresztül direkt módon csökkentti a $(\text{Ca}^{2+})_i$ -ot. További célpontjai között szerepel a HPS₂₀, Epac és a G_q szignalizációs útvonal, valamint a MLCK foszforilálása, amelyen keresztül csökkent Ca^{2+} érzékenységhez vezet, amely végül légúti simaizom relaxációt okoz. Az ábrát Billington és mtsai 2013 Figure 1 alapján készítettem.

3.4.1. cAMP és Ca²⁺ kapcsolata

Annak ellenére, hogy már közel 50 éve annak, hogy bizonyították a cAMP és Ca²⁺ szignál útvonalak között kapcsolatot (Rasmussen, 1970) még manapság is a legtöbb esetben független útvonalként tekintenek rá. A raktár-vezérelt kalcium csatorna (SOC) az egyik fő szabályozója a Ca²⁺ szignalizációnak a légúti simaizomban, amelyről kimutatták, hogy oda-vissza hatással van a cAMP szignál útvonalra. Ay és munkatársai (Ay és mtsai, 2006) sertésen végzett vizsgálatokon keresztül bizonyították, hogy a cAMP negatívan szabályozza SOC keresztüli Ca²⁺ influxot, de azt is megfigyelték, hogy az ER Ca²⁺ kiürülése fokozza az AC és a cAMP termelődését kiváltó útvonalakat (Lefkimmiatis és mtsai, 2009). Ebben valószínűleg kulcsszerepe van a sztrómális interakciós molekula 1. altípusának (Stim1), amely az ER membránjában található, de az intracelluláris Ca²⁺ raktárak kiürülésének a hatására közel kerül a plazma membránhoz (Zhang és mtsai, 2005) és a raktár kiürülést, vagy az agonista stimulációt követő SOC a Ca²⁺ influx kiváltásában játszik szerepet (Peel és mtsai, 2006). Martin és munkatársai leírták, hogy a kalcium felszabadulás által aktivált kalcium csatorna fehérje 1 (Orai1) és a Stim1 szerepet játszik az AC működésében (Martin és mtsai, 2009). A receptor-vezérelt kalcium csatorna (ROC) Ca²⁺ influxban is szerepe van a cAMP-nek, mivel bebizonyították, hogy a tranziens receptor potenciál kanonikus alcsalád 6-os típusú (TRPC6) kalcium csatornák aktiválására képes (Shen és mtsai, 2011). A légút simaizom sejtjeiben is megtalálhatók ezek a TRPC6 csatornák, amelyek valószínűleg hatással vannak az agonista indukált Ca²⁺ influxra (Corteling és mtsai, 2004).

3.5. A légúti simaizom relaxáció lehetőségei

A bronchodilatátorokat, azaz a hörhőtágító gyógyszereket két csoportba lehet osztani az alapján, hogy mely farmakológiai mechanizmus felelős a relaxáns hatásért. Az első csoportba azok az anyagok tartoznak, amelyek a kontraktilis mediátorok által kiváltott hatást gátolják, mint szelektív receptor antagonisták, vagy kontrakciót kiváltó mediátorok bioszintézisét és/vagy felszabadulását gátolják. Ide tartoznak az antikolinerg anyagok és leukotrién receptor antagonisták, amelyet ma az asztma kezelésére használnak (Billington és mtsai, 2013). A második csoportot alkotják azok az anyagok, amelyek a kontrakciót kiváltó mediátortól függetlenül funkcionális antagonistaként hatnak a légúti simaizomra (Yamanaka és mtsai, 2003). Ezt a relaxációt számos sejtben belüli útvonalon ki lehet váltani, amelyek végül csökkentik a (Ca²⁺)_i-t koncentrációt és/vagy a kontrakciós fehérjék Ca²⁺ érzékenységét.

Mindezek ellenére négy sejtes mechanizmus jelenti az alapját a légúti simaizomra közvetlenül ható relaxánsoknak, amelyek a következők: (a) a cAMP, vagy (b) a cGMP koncentrációjának a növelése, (c) ciklikus nukleotidok lebontásának gátlása; (d) sejt membrán ion csatorna működésének befolyásolása.

3.6. β_2 -adrenoreceptor agonisták

A légúti simaizom sejtekben a cAMP koncentrációjának a növekedése lejátszódhat GPCR-kapcsolt módon, amelyek közül a β_2 -adrenoreceptoron keresztüli útvonal a legtöbbet tanulmányozott, mivel terápiás célpont az asztmában és a COPD-ben szenvedő betegeknél. Ahogyan a **6. ábra** is szemlélteti, azt követően, hogy a β_2 -adrenoreceptor agonista kapcsolódik a G_s fehérje kapcsolt receptorhoz, a G_s fehérje komplex disszociál G_α és $G_{\beta\gamma}$ dimerré. A $G_{\beta\gamma}$ dimer önmagában is képes elindítani specifikus szignalizációs kaskád folyamatokat, de a G_{sa} alegység az, amely felelős az AC aktiválásáért, és ez katalizálja a ATP átalakulását cAMP-vé és pirofoszfáttá (Billington és Penn, 2003). A β_2 -szelektív adrenoreceptor agonisták bevezetése az 1960-as években forradalmasította az asztma farmakoterápiáját. Az eltelt több mint 50 év ellenére még mindig az asztma és a COPD- elleni gyógymód fő irányvonalát jelentik (Billington és mtsai, 2017). A rövid hatású β_2 -adrenoreceptor agonisták, mint a terbutalin, szalbutamol és fenoterol gyors segítséget jelenthetnek az akut bronchospasmus ellen és védelmet nyújtanak számos bronchokonstriktó kiváltó hatás ellen, mint a mozgás, vagy az allergének belégzése (O'Byrne és Kerstjens, 1996). Az új hosszú hatású β_2 -adrenoreceptor agonisták, (Kume és mtsai, 1994) mint a szalmaterol és a formaterol alkalmazása viszont hatásosabbnak tűnik az asztma tüneteinek kezelésre szemben a rövid hatású β_2 -adrenoreceptor agonistákkal (Pauwels R, O'Byrne, 1997). A β_2 -adrenoreceptor agonisták hatásosságának ellenére gyakori alkalmazásuk receptor deszenzitizációt okozhat (Giovanni és mtsai, 2010).

3.7. Guanilát-cikláz aktivátorok

A guanilát-cikláz felelős a guanozin-trifoszfát (GTP) átalakításáért ciklikus 3',5'-guanozin-monofoszfáttá (cGMP). Két formában fordul elő, oldható és membránkötött enzimként (Knox AJ, Tattersfield, 1995). Az oldható formát képes aktiválni a NO, vagy a nitrovazodilatátorok az enzim hem-prosztetikus csoportjához kötődve, ennek következtében nitrozohem képződik. A hatását a cGMP-függő protein kináz (PKG) aktivációján keresztül fejt ki, amely hatásmechanizmus hasonló a PKA-hoz, beleértve az SR Ca^{2+} felvétel fokozását

(Knox és Tattersfield, 1995) és az SR Ca^{2+} felszabadulás gátlását (Kannan és mtsai, 1997), de egyes kutatások azt mutatják, hogy a BK_{Ca} -ra és más K^+ csatornákra is hatással van (Thirstrup és mtsai, 1997).

3.8. Foszfodiészteráz-gátlók

A cAMP-ot, mint másodlagos hírvivő molekulát, a jel megszűnését követően nagyon gyorsan képesnek kell lenni eliminálni a sejtnek. Ezt a funkciót tölti be a PDE enzimesalád, amely katalizálja a ciklikus foszfát kötés hidrolízisét a cAMP és cGMP-ben, így létrehozva 5'-AMP-t és 5'-GMP-t, amelyek így inaktívak a ciklikus nukleotid szignalizációs útvonalon. A PDE enzimek felfedezése akkor kezdődött el, amikor asztmában szenvedő Henry Hyde Salter 1886-ban megfigyelte, hogyha üres gyomorra iszik egy erős kávé, akkor az megkönnyíti a légzését (Sakula, 1985). Ekkor még a hatásmechanizmus ismeretlen volt, csak későbbiekben bizonyították be, hogy a koffein gyenge, nem szelektív PDE inhibitor. Ashman (Ashman és mtsai, 1963) a patkány vizeletben való cGMP felfedezése során kimutatta a PDE enzimet, amely képes a cAMP inaktiválására. A jelentőségük növekedni látszik a 1970-es években patkány kisagyból történő első izolációja óta (Uzunov és Weiss, 1972), mivel bizonyították, hogy diszfunkciójuk szerepet játszhat az asztma, COPD, és autoimmun betegségek kialakulásában. A PDE-k konzervált katalitikus doménnel rendelkeznek, de az ezen a régió kívüli aminosav szekvencia jelentősen eltérhet. Az V, VI és a IX PDE izoforma cGMP specifikus, a IV, VII és a VIII-as cAMP, amíg az I-III, X-XI mind a cAMP, mind a cGMP hidrolízisére is képesek. A PDE IV izoforma központi szerepet tölt be a légúti simaizom relaxációjában a PDE III és PDE V mellett emberekben (De Boer és mtsai, 1992; Cortijo és mtsai, 1993) és tengerimalacokban (Miyamoto és mtsai, 1994). Annak ellenére, hogy a PDE III, mind a PDE IV képes a cAMP eliminálására a PDE III alkalmazhatóságát korlátozza, hogy szívizomsejtek és a légúti simaizomsejtekben játszott cAMP koncentráció szabályozó szerepe nem választható szét, ezért olyan életveszélyes mellékhatásokat okozhat, mint például az aritmia (Yan és mtsai, 2007). A fellépő mellékhatások miatt különböző struktúrájú inhibitorokat fejlesztettek ki, de csak kevés jutott el a törzskönyvezésig, mivel az enzimet nemcsak a célszövetben gátolták (Robichaud és mtsai, 2002). Ennek ellenére a szelektív inhibitorok fejlesztése még mindig a gyógyszerfejlesztés fő vonalába tartozik. A fentebb említett problémát különböző gyógyszerbeviteli módokkal próbálják megoldani, mint például a phthalazinone származékok helyi alkalmazásával dermatitisz esetében (Kagayama

és mtsai, 2009), vagy a légúti gyulladás kezelését PDE IV inhibitorok inhalációjával (Page és Spina, 2012).

3.8.1. Teofillin

Több évtizede úgy tekintenek a teofillinre (1,3-dimetilxantin) és más xantin származékokra, mint hatékony ágensek a reverzibilis és krónikus obstruktív légúti megbetegedések kezelésére (Milgrom H, Bender, 1993). A β_2 -adrenoreceptor agonisták elterjedésével azonban használata visszaszorulni látszik, főként a magas terápiás dózis kiváltotta mellékhatások miatt manapság már csak kiegészítő terápiának használják. Bronchodilatátor hatását a PDE III és PDE IV gátlásán keresztül fejt ki, amíg a gyulladásgátló hatása valószínűleg a hiszton deacetiláz aktivációnak (HDAC) tulajdonítható (Ito és mtsai, 2002), amely képes a gyulladásos folyamatokban szerepet játszó gének kikapcsolására. Ez a hatása különösen fontos lehet a súlyos asztmában és COPD-ben szenvedőknek, mivel a HDAC2 aktiválása révén képes visszafordítani a kortikoszteroid rezisztenciát (Adcock és mtsai, 2005). A teofillin terápiás dózisban viszont gyenge bronchodilatátor, ami azt sugallja, hogy valószínűleg más sejt típusok relevánsabbak lehetnek az asztma ellenes hatás kiváltásában. Az emberi légúti preparátumon mért légúti simaizom relaxáló hatás EC_{50} értéke $1,5 \times 10^{-4}$ (Barnes, 2010), amely jóval a terápiás dózis felett van. Emberi tüdő kivonatból készült mintán kimutatták, hogy terápiás koncentrációban a PDE aktivitás 5-10%-át gátolja csak (Poolson és mtsai, 1978). A teofillinnel végzett *in vitro* kísérletek bebizonyították, hogy egyaránt képes ernyeszteni mind a nagy, mind a kis légutakat (Finney és mtsai, 1985). Annak ellenére, hogy a teofillin valószínűleg β -agonista is (Barnes, 2010) az összes légúti preparátumot képes volt ernyeszteni, míg a β -agonisták, csak a 25%-át (Guillot és mtsai, 1984). A β -agonistákon keresztül növelt cAMP koncentráció, valószínűleg fokozza a PDE-ok aktivitását, amely korlátozza a hatásukat szemben a teofilinnel. Egy kísérletben asztmás betegekből vett alveoláris makrofágok fokozott PDE aktivitást mutattak ki (Bachelet és mtsai, 1991). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a teofillin valószínűleg jobban gátolja az asztmában szenvedők PDE IV-t, mint a nem asztmások esetében. Ezt támasztja alá az is, hogy normál tüdőben nem okoz bronchodilatációt szemben az asztmában szenvedőkével (Estenne és mtsai, 1980).

3.8.2. Papaverin

Kukovetz és Pötz 1970-ben kimutatta, hogy a PDE gátlásra nem csak a metilxantinok képesek, hanem eltérő szerkezetű anyagok is, mint a mákból származó alkaloid a papaverin, amelyet 1848-ban fedezett fel George Merck. A papaverin fő benzil-izokinolin alkaloidja az ópiumnak, amely számos simaizom relaxációjára képes (Pösch és Kukovetz, 1971). Éveken keresztül a papaverint vazodilatátorként alkalmazták és hatását a PDE gátlásán keresztül cAMP növelésével magyarázták, annak ellenére, hogy a cAMP szint növekedés nem előfeltétele számos simaizom relaxációjának (Diamond és Marshall, 1969; Diamond és Holmes 1975; Clyman és mtsai, 1976). Ezért felmerült az intracelluláris cAMP koncentráció fokozása mellett, a Ca^{2+} dinamikájának befolyásolása (Shimizu és mtsai, 2000). Tomiyama és munkatársai megfigyelték tengerimalac coecumon végzett vizsgálaton, hogy a papaverin csökkenti a Ca^{2+} influxot és képes relaxálni a KCl indukált kontraktúrát (Tomiyama és mtsai, 1973) majd 4 évvel később, 1979-ben Huddart és Saad kimutatta a patkány ileum ritmikus spontán kontrakciójának gátlása a papaverin által kiváltott Ca^{2+} influx gátlásának tulajdonítható. Emberi corpus cavernosum KCl indukált kontrakcióját dózis függő módon képes volt gátolni főként az L-VOCC-n keresztül Ca^{2+} által (Kimoto és Kessler, 1990). Évekkel később, 1992-ben Iguchi azt találta, hogy a papaverin képes légúti simaizom relaxációt is előidézni, amelyben szintén szerepe van a L-VOCC keresztül Ca^{2+} influx gátlásának (Iguchi és mtsai, 1992).

3.8.3. Drotaverin

A drotaverin perparinból származékképzéssel előállított vegyület, 1962-ben került forgalomba Magyarországon, amelyet ma NO-SPA néven hoz forgalomba a SANOFI-AVENTIS Zrt. A felfedezése 1961-ben Mészáros Zoltánhoz és Szentmiklósi Péterhez fűződik (Mészáros és mtsai, 1961). Munkájuk elismeréséül Mészáros és Szentmiklósi 1970-ben állami díjat kaptak. A drotaverin szelektív PDE IV gátló, kimutatták, hogy hatása hasonló rolipraméhoz, amely prototípusa a szelektív PDE IV gátlóknak (Palfreyman MN, Souness, 1996). A drotaverinnel számos farmakológiai vizsgálatot végeztek felfedezése óta és kiderült, hogy hatékonyabb görcsoldó, mint a papaverin (Korbonits, 1996). Savel 1980-ban kimutatta, hogy a patkányból izolált duodenum és tengerimalac ileum preparátumon acetilkolin és hisztamin kiváltotta kontrakción akár négyszer hatékonyabb is lehet a papaverinnél (Savel, 1980). A simaizom relaxáló hatás hatékonyságát bizonyította a kutyák epehólyag kontrakció

ernyesztésének vizsgálata során is (Shimohira és mtsai, 1980^a). A drotaverin hatással van, nemcsak a szervekben, hanem az erek falában található simaizomra is. Kimutatták, hogy hatékonyan ernyeszti a noradrenalin kiváltotta kontrakciót izolált nyúl aorta preparátumon (Shimohira és mtsai, 1980^b). A drotaverin hatékonyságát a gyomor-bél traktus, epe, urológiai és nőgyógyászati kezeléseknél a cAMP akkumuláció okozta simaizom relaxációval magyarázzák, viszont a papaverinhez hasonlóan a Ca^{2+} influxra gyakorolt hatása is felmerülhet, mivel patkány méh simaizomzatában kimutatták, hogy a PDE enzimek mellett megtalálhatóak a L-típusú Ca^{2+} csatornák is (Inoue, Y., Sperlakis, 1991), amelyeken Ca^{2+} -csatorna antagonistákkal végzett vizsgálat során kiderült, hogy méh simaizom erős relaxáló hatást váltanak ki (Higby és Suiter, 1999). Tömösközi és munkatársai (2002) receptor-kötés vizsgálatokat végeztek vemhes patkány méh simaizomzatán. A kapott eredmények azt mutatták, hogy a drotaverin koncentráció-függő módon képes volt leszorítani kötőhelyről a dihidropiridin típusú Ca^{2+} -csatorna blokkoló (^3H) nitrendipint, valamint képes volt IC_{50} koncentrációban meggátolni a (^3H) nitrendipint kötődését.

3.9. A Ca^{2+} influx gátlása

Számos különböző ioncsatorna található a simaizom sejt membránjában, de a VOC és az ATP-érzékeny K^+ csatornák (K_{ATP}) a gyógyszerek fő célpontjai. Már közel 50 éve annak, hogy egy német fiziológus Albrecht Fleckenstein felfedezte, hogy szerves molekulák, mint a verapamil hatása nagyon hasonló a β -adrenerg receptor antagonisták kardiodepresszáns hatásához (Acierno és Worrell, 2004). Szerkezetileg három nagy csoportra lehet osztani a szerves Ca^{2+} -csatorna blokkolókat: dihidropiridinek (prototípusa a nifedipin), fenilalkilaminok (prototípusa a verapamil) és benzotiazepinek (prototípusa a (+)-cisz-diltiazem). A dihidropiridinek és a hozzájuk kapcsolódó gyógyszerek, mint például a Ca^{2+} -csatorna blokkolók, bevezetése a hipertenzió és a miokardiális ischemia kezelését követően számos kísérlet foglalkozott a gyógyszerek lehetséges légúti simaizom relaxáns hatásának a tesztelésével. *In vitro* a Ca^{2+} -csatorna blokkolók képesek szelektíven kötődni az L-VOCC-hez (Godfraind és mtsai, 1986), így különböző stimulusok által kiváltott légúti simaizom kontrakció ernyesztésére, de körülbelül két nagyságrenddel hatékonyabbak a depolarizáció, mint például a magas extracelluláris K^+ koncentráció okozta kontrakció ernyesztésére (Advenier és mtsai, 1984; Nielsen-Kudsk és mtsai, 1986). Ez összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy a farmako-mechanikai kapcsolat során az intracelluláris Ca^{2+} raktárak és a Ca^{2+} influx az ROC-on keresztül történik inkább, mint a L-VOCC-n, ezért számos

esetben vizsgálták a Ca^{2+} -csatorna blokkolók hatékonyságát az asztma kezelésében (Barnes, 1983; Barnes, 1985).

3.9.1. Nifedipin

A nifedipin (Adalat) a dihidropiridin típusú Ca^{2+} -csatorna blokkolókhöz tartozik, amelyet a Bayer kutatói indikációt keresve küldtek Albrecht Fleckensteinnek tesztelésre az 1960-as években, aki azt nyilatkozta hogy, "még sosem volt ennyire hatékony antagonist a kezei között" (Kroneberg, 1992). A kezdeti kísérletekben angina kezelésére tesztelték, amelyre 1975-ben meg is kapták az engedélyt (Kazda, 1991). De a nifedipin hatékonynak bizonyult a perifériális arteriolák simaizmánának az ernyesztésében, amelyet így további kísérletek követtek. A magas vérnyomást is csökkentette, ezért 1981-ben kiterjesztették a hipertenzió kezelésére (Di Somma és mtsai, 1996). Godfraind kimutatta, hogy koncentrációfüggő módon képes gátolni a KCl depolarizáció kiváltotta kontrakciót izolált patkány artérián (Godfraind, 1983). De a számos nifedipinnel végzett állatkísérlet során bebizonyították, hogy nemcsak a depolarizáció kiváltotta kontrakciót, hanem a prosztaglandin és hisztamin (Male és mtsai, 1982) valamint a citromsav, metakolin és antigén indukálta bronchokonstriktiót is relaxálja *in vivo* (Burgman és mtsai, 1983) és *in vitro* modelleken (Fanta és mtsai, 1982). Cerrina demonstrálta, hogy nifedipin alkalmazása asztmás betegeken gátolja a mozgás indukálta bronchokonstriktiót (Cerrina és mtsai, 1981). Drazen és munkatársai légcső preparátumon végeztek kísérletet, ahol a nifedipin hatékonyan ernyesztette a hisztamin összehúzott légcsövet (Drazen és mtsai, 1983) viszont a nyugalmi tónusra nem volt hatással. A sikeres kísérletek ellenére az asztmás betegeknél kialakult bronchokonstriktiót nem volt képes visszafordítani, sem pedig a dohányzó férfiakon metakolinnal kiváltott kontrakció gátlására nem volt alkalmas (Zindal és mtsai, 1985).

3.9.2. Diltazem

A diltiazem a prototípusa a benzotiazepin típusú Ca^{2+} -csatorna blokkolóknak, amelyről 1971-ben Sato anesztetizált kutyákon megfigyelte, hogy a koszorúereken erős vazodilatációs hatást vált ki (Sato és mtsai, 1971). Majd azt követően, 1975-ben rájöttek, hogy a diltiazem hatását a Ca^{2+} -csatorna blokkoló képessége okozza. Számos kísérletben igazolták hatékonyságát a koszorú erek relaxációján (Yasue és mtsai, 1979) és az angina pectoris kezelésében (Low és mtsai, 1981). Ezt követően *in vitro* modelleken bizonyították, hogy a diltiazem hatékony lehet a bronchokonstriktió kezelésére is. Ehhez a kísérlethez Advenier

tengerimalac trachea preparátumot használt, majd az értékelést követően azt találta, hogy a diltiazem a depolarizáció kiváltotta kontrakciót dóziszfüggő módon ernyesztette (Advenier és mtsai, 1984), amit ezt követően Koga kísérletei is igazoltak (Koga és mtsai, 1989). Annak ellenére, hogy *in vitro* a diltiazem képes volt a karbakol kiváltotta kontrakciót ernyeszteni (Hirota és mtsai, 2003) *in vivo* nem bizonyult elég hatásosnak az asztmában szenvedők metakolinnal, (Hendeles és mtsai, 1988) vagy karbakollal (Hartmann és Magnussen, 1985) kiváltott kontrakciójának ernyesztésére és a testmozgás közbeni hideg levegő okozta kontrakció ernyesztésénél sem mutatott szignifikáns eltérést (Magnussen H, Hartmann, 1984).

3.10. Vazoaktív intesztinális peptid

A vazoaktív intesztinális peptid (VIP) egy 28 aminosavból álló neuropeptid, amely széles körben előfordul az emberi szervezetben, beleértve a tüdőt (Said, 1994). A légutakban a VIP-t tartalmazó idegsejtek a légcsőrendszer simaizom rétegében található (Maggi és mtsai, 1995). Asztmás betegeket vizsgálva kimutatták, hogy inhalációja, vagy infúziója, csak kis mértékű bronchodilatációt okoz, de védelmet nyújt a hisztaminnal kiváltott bronchokonstrikció ellen (Morice és mtsai, 1983). A hisztaminnal összehúzott tengerimalac légcső preparátumot legalább egy nagyságrenddel hatékonyabban ernyeszti a szalbutamollal, vagy a terbutilinnal szemben (Thirstrup és mtsai, 1997). A légutak epitéliumában található VIP lebontását végző enzimek gátlása szintén fokozza a VIP relaxáló hatását (Tam és mtsai, 1990). A VIP hatását az AC stimulációjára ható GPCR-on fejt ki (Alexander és Peters, 1999), ezáltal fokozva a cAMP szintjét (Frandsen és mtsai, 1978). Összehasonlítva a VIP hatását a PDE blokkolókkal, tengerimalac tracheán azt találták, hogy valószínűleg további sejtes hatás is szerepet játszhat a VIP kiváltotta relaxációban (Shikada és mtsai, 1991). Ebben a további relaxáló hatásban valószínűleg a Na⁺-K⁺-ATPáz (Morrison és Vanhoutte, 1996) és a BK_{Ca} aktivációja (Thirstrup és mtsai, 1997) játszik szerepet.

4. Célkitűzések

A célunk olyan kísérleti módszerek kidolgozása volt, melyekkel egyértelműen bizonyítható, hogy a drotaverin PDE IV blokkoló hatása mellett funkcionális L-VOCC gátló hatással is rendelkezik. A cAMP mellett a Ca^{2+} szintén alapvető a légúti simaizom működés szempontjából, ezért kézenfekvőnek tűnt, hogy légúti simaizom preparátumon vizsgáljuk a drotaverin kalcium antagonistá hatását. A cél megvalósításához a következő kísérleti megközelítéseket használtuk fel:

- 1) KCl depolarizáció kiváltotta simaizom kontrakciót. Az irodalomból ismert, hogy a magas extracelluláris KCl koncentráció képes depolarizálni a légúti simaizom sejteket, így az extracelluláris térből Ca^{2+} influxon keresztül kontrakciót okozni. Feltételezhető, hogy ha a drotaverinnek van L-VOCC blokkoló hatása, akkor a vegyület gátolni fogja a KCl kiváltotta kontrakciót.
- 2) A simaizom Ca^{2+} raktárak L-VOCC-on keresztüli újratöltődésének (nyugalmi Ca^{2+} újratöltődés) jelenségét. A kalcium depletált preparátum kalcium tartalmú oldatban agonista beadása nélkül is képes újratelíteni kalcium raktárait. Az újratöltődést követő kontrakció mértékén keresztül ez által az L-VOCC-re gyakorolt gátló hatás mérhetővé válik.
- 3) A simaizom Ca^{2+} raktárak ROC és L-VOCC-on keresztüli újratöltődését (receptor aktivációt követő Ca^{2+} újratöltődés). A kalcium depletált preparátumon kalcium hatására kontrakció váltható ki oldatban lévő agonista mellett. A kialakulásának a sebessége (meredekség) az L-VOCC blokkoltság mértékére jellemző paraméter lesz.
- 4) A simaizmok receptor aktiváción és depolarizáción alapuló kontraktúrája utáni simaizom ernyesztést. Az L-VOCC-t blokkolni képes anyagok eltérő hatékonyságot mutatnak a két kontraktúra ernyesztésében. Összehasonlítva a drotaverin hatáserősségét a receptor aktiváció és depolarizáció kiváltotta kontraktúra ernyesztésén, az L-VOCC-re gyakorolt gátló hatás kimutathatóvá válik.
- 5) A simaizom preparátumok receptor aktiváción és depolarizáción alapuló kontrakciójának gátlása közötti mechanisztikus különbségeket. A receptor aktivációt követő intracelluláris raktárakból történő kalcium felszabadulással és az extracelluláris térből való kalcium influx segítségével kiváltott kontrakción keresztül a drotaverin preventív hatásának mechanizmusa elkülöníthetővé válik.

5. Anyagok és módszerek

5.1. Vegyszerek

A kálium-kloridot, kalcium-klorid-dihidrátot, kálium-dihidrogén foszfátot, nátrium-hidrogén-karbonátot, magnézium-szulfát-heptahidrátot a Merck Inc-től (Darmstadt, Németország), a nátrium-kloridot a Reanal ZRT-től (Budapest, Magyarország), drotaverin-hidrokloridot a Chinoin Zrt.-től (Sanofi group, Budapest, Magyarország), etilén-glikol-tetraecetsavat, az indometacint, nifedipint, teofillint, papaverin-hidrokloridot, diltiazem-hidrokloridot, acetil-béta-metilcolin-kloridot, hisztamint-dihidrokloridot, D-(+)-glükózt Sigma-tól (St Luis, MO) szereztük be.

5.2. Állatok

A kísérletekhez 300-350 g testtömegű hím Dunkin-Hartley tengerimalacokat használtunk, amelyek az INNOVO Ltd.-ből (Gödöllő, Hungary) rendeltünk meg. Az állatokat nyitott ketrecekben tartottuk, hőmérséklet szabályozott (21-23°C) és szellőzéssel ellátott környezetben, 12 órás sötét-világos ciklusokkal. A víz és az aszkorbinsav tartalmú tengerimalac táplálék (Altromin) *ad libitum* rendelkezésre állt. Az állatokat szövetdonorként használtuk fel, amelyhez az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács (ÁTET) engedély beszerzése nem volt szükséges. Azonban, mint szövetdonor állatok a NÉBIH felé az éves összesítésben jelentésre kerültek.

5.3. Oldatok

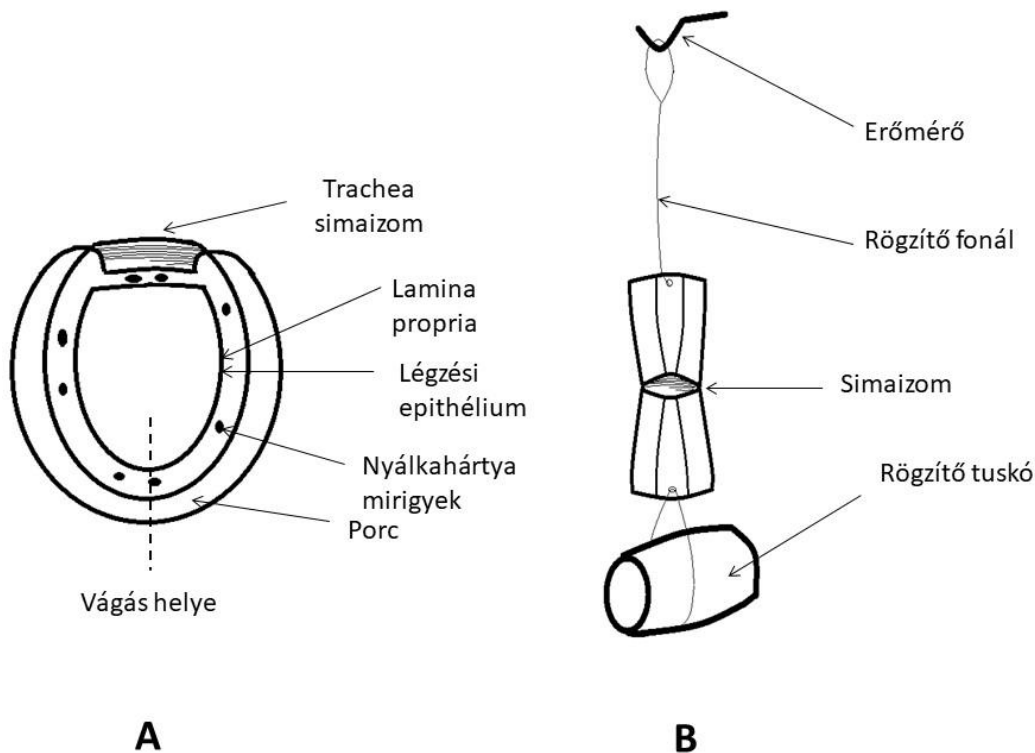
Normál Krebs-Henseleit oldat összetétele: 119 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 2,5 mM CaCl₂, 4,7 mM KCl, 1 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 11,1 mM glükózt, 5x10⁻⁶ M indometacin.

Intracelluláris kalcium raktár kiürítésére használt Ca²⁺-mentes Krebs-Henseleit oldat összetétele: 119 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 4,7 mM KCl, 1 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 11,1 mM glükózt, 5x10⁻⁶ M indometacin, 0,25 mM EGTA.

5.4. Módszerek

5.4.1. Légcső izolációja és preparálása szervfürdőhöz

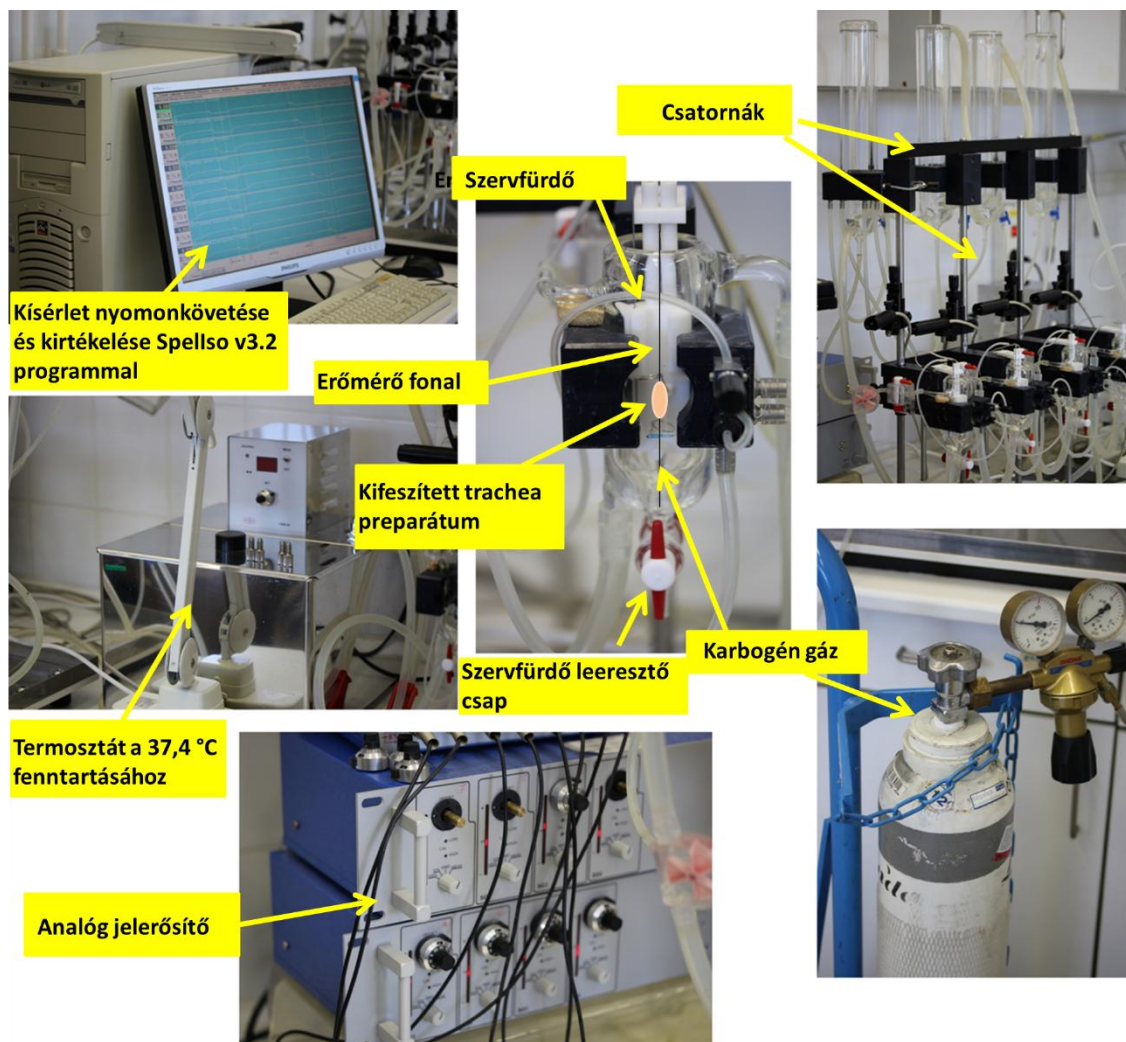
Az előre elkészített Krebs-Henseleit oldatot karbogén gázzal (95% O₂+5% CO₂) átbuborékolattuk, hogy biztosítsuk a megfelelő O₂ tenziót és a 7,4±0,1 pH-t. Ezt követően a tengerimalacot pentobarbitállal elaltattuk, majd a mély alvásban lévő állatból kimetsztük a légcsövet és egy előre elkészített Krebs-Henseleit oldatot tartalmazó preparáló tálba helyeztük. A légcsőből 3-4 porcgyűrű szélességű karikákat készítettünk, amelyet a simaizommal átellenes oldalon átmetszettünk és szétnyitottunk a **7. ábra** szerint.



7. ábra: A légcsőből vágott 2-3 mm vastagságú karika szerkezete (A), valamint a preparátum erőmérőre való felhelyezésének módja (B).

A szétnyitott trachea csík két végére egy-egy fonalat öltöttünk be, majd a preparátum egyik végére hurkot kötöttünk, amíg a másik végén lévő fonalat szabadon hagytuk. A preparátumot a lehető leggyorsabban áthelyeztük a 20 ml-térfogatú szervfürdőbe, amelynek

állandó 37,4°C -os hőmérsékletét termosztáttal segítségével biztosítottuk. A szervfürdőben levő Krebs-Henseleit oldatot karbogen gázzal folyamatosan buborékolattuk, hogy a kísérlet ideje alatt fennmaradjon a megfelelő O₂ tenzió és a 7,4±0,1 pH. A preparátumhoz kötött fonal szabadon hagyott végére is egy hurkot kötöttünk, amelyet az erőmérőre akasztottunk (7. ábra). Ezt követően a preparátumokat 5 mN-ig feszítettük meg, majd 1 órán keresztül hagytuk inkubálódni. Az inkubáció alatt a Krebs-Henseleit oldatot 15 percnként cseréltük. Egy tengerimalacból összesen 8 preparátumot készítettünk, amelyeket ugyanazon a napon, ugyanabban a kísérletben használtunk fel. A 8 preparátumból 4 szolgált kontrollként, 4 pedig a kiválasztott teszt anyagok egyikét kapta. Az izometrikus kontrakciót egy erősítővel ellátott erőmérő segítségével mértük, amelyet az Experimetria Kft. (Budapest, Magyarország) gyártott. A kísérlet során kapott nyers adatok kiértékeléséhez számítógépes programot, Spellso v3.2 szoftver használtunk (Experimetria Kft.). A berendezést a 8. ábra szemlélteti.



8. ábra: Szervfürdő mérési elrendezése.

5.4.2. Hisztamin, metakolin és KCl EC₅₀ értékének a meghatározása

Az EC₅₀ értékek meghatározását normál Krebs-Henseleit oldatban, frissen elkészített preparátumokon végeztük. Összesen 8 preparátumot használtunk fel minden kísérletben. Az inkubációt követően a preparátumokon a konstriktorok dózisainak egymásra adásával dózis-hatás sort készítettünk. A kimosást követően a dózis-hatás sort még egyszer megismételtük. Az így kapott egyes dózisokhoz tartozó maximális feszülés értékekből a Graph Pad Prism 6 (La Jolla, USA) program segítségével meghatároztuk a három konstriktorhoz tartozó EC₅₀ értékeket.

Az alkalmazott koncentrációk a következők voltak:

- KCl: 1 mM, 3 mM, 10 mM, 30 mM, 100 mM
- Hisztamin: 100 nM, 300 nM, 1 μM, 3 μM, 10 μM, 30 μM.
- Metakolin: 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μM, 3 μM, 10 μM, 30 μM, 100 μM.

5.4.3. KCl kiváltotta kontrakció vizsgálata

A normál Krebs-Henseleit oldatban való inkubációs idő lejárta után a trachea preparátumok kontrakcióját a KCl növekvő dózisainak (20, 30, 50 mM) egymásra adásával, ún. kumulatív módon váltottuk ki. A KCl kumulatív dózis-hatás sort két alkalommal ismételtük meg mind a 8 preparátumon, mielőtt 4 preparátumnak a vizsgálati anyagok egyikét, azaz drotaverint / papaverint / nifedipint / diltiazemet / teofillint / teofillin+nifedipin keveréket, 4 preparátumnak pedig a vizsgálati anyagok oldószerét (kontroll) adtuk. A második KCl koncentráció-hatás görbe kimosása után 4 preparátum szervfürdőjébe beadtuk a vizsgálati anyag első dózisát (10^{-7} M), míg a kontroll szervek csak a vivőanyagot kapták. Tizenöt perces inkubációt követően minden egyes preparátumnál kiváltottunk egy újabb KCl dózis-hatás sort. Ezt mosási periódus követte. Miután a preparátum tónusa visszaállt az alapvonalra ismét beadtuk ugyanazon vizsgálati anyag következő (10^{-6} M) dózisát annak a 4 preparátumnak, amely előzőleg is a tesztelt anyagot kapta, míg a másik 4 szerv ismét vivőanyagot kapott. Kimosást követően az előbb leírt folyamatot még egy alkalommal megismételtük, a kísérleti anyagok 10^{-5} M koncentrációját használva. Minden egyes kísérletben egyetlen vizsgálati anyag hatását teszteltük a kontrollal szemben, majd megismételtük a kísérletet a fentebb említett anyagok egyikével.

5.4.4. Nyugalmi újratöltődés vizsgálata

Az inkubációs idő lejárta után mind a nyolc preparátumon 3×10^{-6} M hisztaminnal, vagy 5×10^{-7} M metakolinnal két, egymástól mosással elválasztott, kontrakciót váltottunk ki. A második agonista dózis kimosása után, amikor a kontrakció visszaállt az alapvonalra, a Ca^{2+} raktárak kiürítéséhez a szervfürdőben lecseréltük a normál Krebs-Henseleit oldatot Ca^{2+} mentes Krebs-Henseleit oldatra. Rövid inkubációs időt követően mind a 8 preparátumon, mosási szakaszokkal megszakítva, három alkalommal megismételtük a 3×10^{-6} M-os hisztamin, vagy a 5×10^{-7} M-os metakolin beadást. A Ca^{2+} mentes közegben harmadik agonista hatására a preparátumok már nem voltak képesek kontrakcióra. Ekkor a kontroll csoportban ($n=4$) a szervfürdőhöz adtuk a vivőanyag megfelelő mennyiségét, míg a vizsgálati anyaggal kezelt csoportban ($n=4$) a szerveket drotaverin / papaverin / nifedipin / diltiazem / teofillin / teofillin+nifedipin keverék 10^{-5} M dóziséval inkubáltuk. A 15 perc inkubációs idő után a Ca^{2+} raktárak újratöltése céljából az eddig használt Ca^{2+} -mentes Krebs-Henseleit oldatot a kontroll csoportban normál, míg a teszt anyag kezelt csoportban 10^{-5} M tesztanyag tartalmú Krebs-Henseleit oldatra cseréltük. A Ca^{2+} raktárak újratöltődésére 30 perc inkubációs időt hagytunk, majd a Krebs-Henseleit oldatot mind a két csoportnál Ca^{2+} -mentesre cseréltük. Ezután mind a 8 preparátumon, mosási szakaszok beiktatásával 3 alkalommal beadtuk, vagy a 3×10^{-6} M hisztamint, vagy 5×10^{-7} metakolint. Az agonisták közötti mosási lépéseket mindig addig végeztük, amíg az agonista előtti simaizom tónus visszatért.

5.4.5. Receptor aktivációt követő intracelluláris Ca^{2+} refill (CaCl_2 kiváltott kontrakció)

Ezen protokoll megegyezik a fentebbi 5.4.4 pontban említett protokollal a Ca^{2+} -mentes Krebs-Henseleit oldatban kiváltott 3. kontrakcióig. A Ca^{2+} -mentes oldatba a harmadik 3×10^{-6} M hisztamin, vagy 5×10^{-7} M metakolin beadását követően 4 szervhez hozzáadtuk a teszt anyagok egyikének (drotaverin / papaverin / nifedipin / diltiazem / teofillin / teofillin+nifedipin keverék) 10^{-5} M dózisát, ellenben a másik 4 szerv vivőanyagot kapott (kontroll). Tíz perces inkubáció után mind a kezelt, mind a kontroll csoporthoz hozzáadtunk 2,5 mM CaCl_2 oldatot. CaCl_2 hatására a preparátumok összehúzódtak. Az összehúzódás sebessége attól függött, hogy a teszt vegyület blokkolta, vagy nem blokkolta a L-VOCC-at. Ebben a kísérleti protokollban nem a kontrakció mértéke, inkább a kontrakció kialakulásának a sebessége (meredekség) volt az L-VOCC blokkoltság mértékére jellemző paraméter.

5.4.6. Összehúzott preparátum ernyesztése

Ebben a kísérleti protokollban azt tanulmányoztuk, hogy a kísérleti anyagok milyen hatékonysággal ernyesztik a már kialakult légúti simaizom kontrakciót. Ez a protokoll az *in vivo* broncholitikus hatás analógjának feleltethető meg. Az inkubációt követően mind a 8 preparátumot 3×10^{-6} M hisztaminnal, vagy 5×10^{-7} M metakolinnal, vagy 20 mM KCl-al izomösszehúzódást váltottunk ki. Amikor a megnövekedett izomtónus stabilizálódott (kontraktúra), a vizsgálati anyag (drotaverin / nifedipin / teofillin) növekvő koncentrációjú oldatait, kumulatív módon adtuk a szervfürdőbe. A vizsgálati anyag utolsó dózisát követően, a maximális relaxáció elérése érdekében, 0,25 mM EGTA-t adtunk be, (extracelluláris Ca^{2+} megkötése) minden egyes preparátum szervfürdőjébe.

5.4.7. Kontrakció kialakulásának gátlása

Ebben a kísérleti protokollban azt tanulmányoztuk, hogy a kísérleti anyagok milyen hatékonysággal képesek gátolni a légúti simaizom kontrakciót. Ennek a vizsgálatához az inkubációt követően mind a 8 preparátumon 3×10^{-6} M hisztaminnal, vagy 5×10^{-7} M metakolinnal, vagy 20 mM KCl-al izomösszehúzódást váltottunk ki. Amikor a kontrakció elérte a maximumát, akkor a konstriktor anyagot kimostuk a szervfürdőből, és megismételtük az agonisták beadását. A második kontrakció utáni kimosást követően, amikor a tónus elérte az alap értéket a szervfürdőhöz adtuk a teszt anyag (drotaverin / nifedipin / teofillin) első dózisát. A 10 perces inkubációt követően ismét beadtuk a konstriktor anyagot. A kontrakciós maximum elérése után kimostuk a szervfürdőből. Miután a simaizom tónus visszaállt a kiindulási értékre a konstriktor második dózisának beadását követően ismét 10 percig inkubáltuk, majd az előbb leírtak szerint váltottunk ki simaizom kontrakciót. A teszt anyag növekvő koncentrációival addig folytattuk a leírt körfolyamatokat, ameddig a konstriktorok nem, vagy már alig voltak képesek kontrakciót kiváltani. Az utolsó kimosási szakaszt követően 0,25 mM EGTA-t adtunk a szervfürdőbe, hogy az extracelluláris Ca^{2+} megkötése révén megkapjuk a relaxáció maximum értékét.

Statisztikai analízis

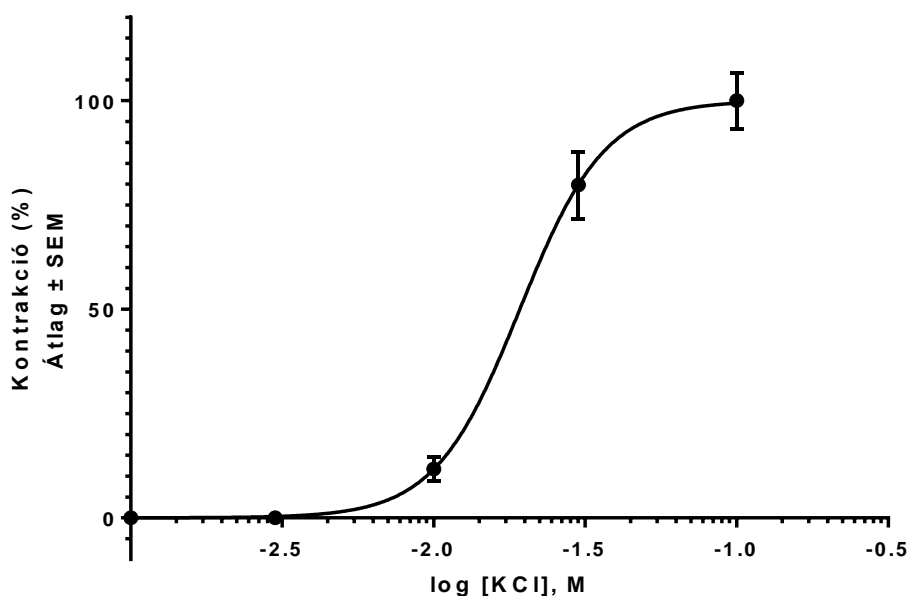
Statisztikai analízis során a kontroll és a kezelt csoportok maximális feszülési értékeinek az összehasonlítására kétmintás t-próbát alkalmaztunk. A koncentráció-hatás görbék összehasonlítását F-próbával végeztük el. A próbák eredményét akkor tekintettük szignifikánsnak, ha értéke kisebb volt, mint 0,05. A statisztikai analízisekhez és az eredmények ábrázolásához is GraphPad Prism 6 szoftvert használtunk.

6. Eredmények

A drotaverin L-VOCC-ra gyakorolt funkcionális hatásának a teszteléséhez tengerimalac légúti simaizom preparátumon kontrakciókat váltottunk ki KCl, hisztamin és metakolin segítségével. A három eltérő mediátor kiválasztását az indokolta, hogy a KCl depolarizáción keresztül okoz Ca^{2+} influxot, a hisztamin a légúti simaizom sejtben található H1 receptoron, amíg a metakolin a M3 receptoron keresztül szabadítja fel a SR-ben raktározott Ca^{2+} -ot. Mivel hatáserősségük eltérő, ezért olyan koncentrációban kellett alkalmaznunk őket, amelyek azonos mértékű választ váltanak ki. Első lépésben előkísérleteket végeztünk annak érdekében, hogy meghatározzuk a maximális légúti simaizom kontrakció 50%-át kiváltani képes KCl, hisztamin és metakolin koncentrációt.

6.1 KCl EC_{50} értékének meghatározása

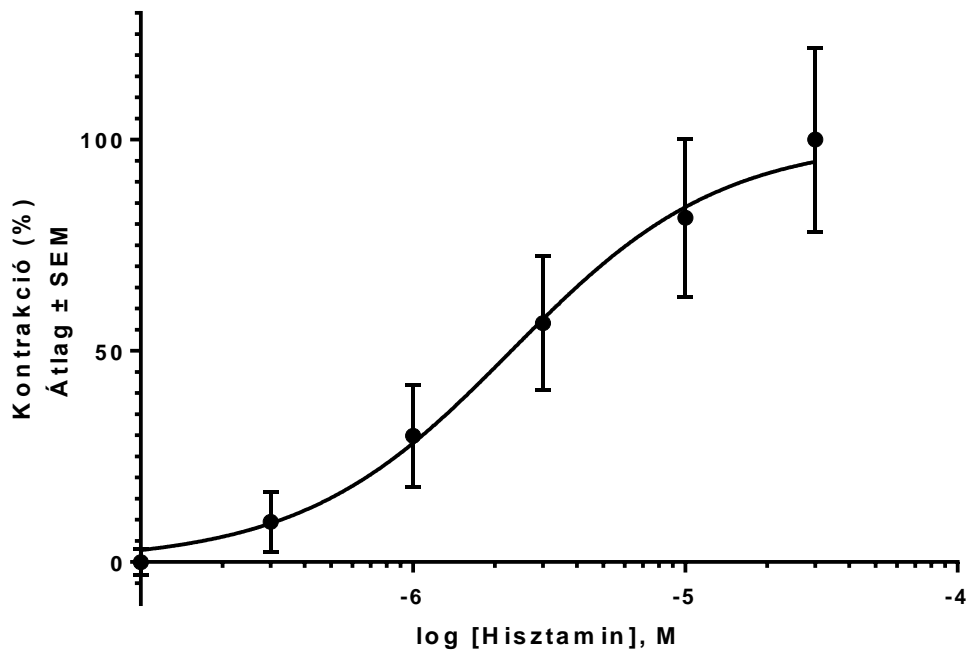
Az emelkedő KCl koncentráció fokozódó légúti simaizom kontrakciót váltott ki, amelynek maximum értékei és szórása a következők voltak: $-0,04 \pm 0,06$; $-0,04 \pm 0,08$; $1,22 \pm 0,83$; $8,53 \pm 2,28$; $10,70 \pm 1,91$ mN. A kapott értékeket felhasználva meghatároztuk a koncentráció-hatás görbéből a KCl EC_{50} értékét, amely 2×10^{-2} M volt. A KCl koncentráció-hatás görbét a **9. ábra** mutatja.



9 ábra: Tengerimalac trachea preparátumon mért KCl koncentráció-hatás görbe. A KCl EC_{50} értékének meghatározásához az egyes dózisok egymásra adásával (kumulatíván) fokoztuk a kontrakció mértékét. $\text{EC}_{50} = 2 \times 10^{-2}$ M.

6.2. Hisztamin EC₅₀ értékének meghatározása

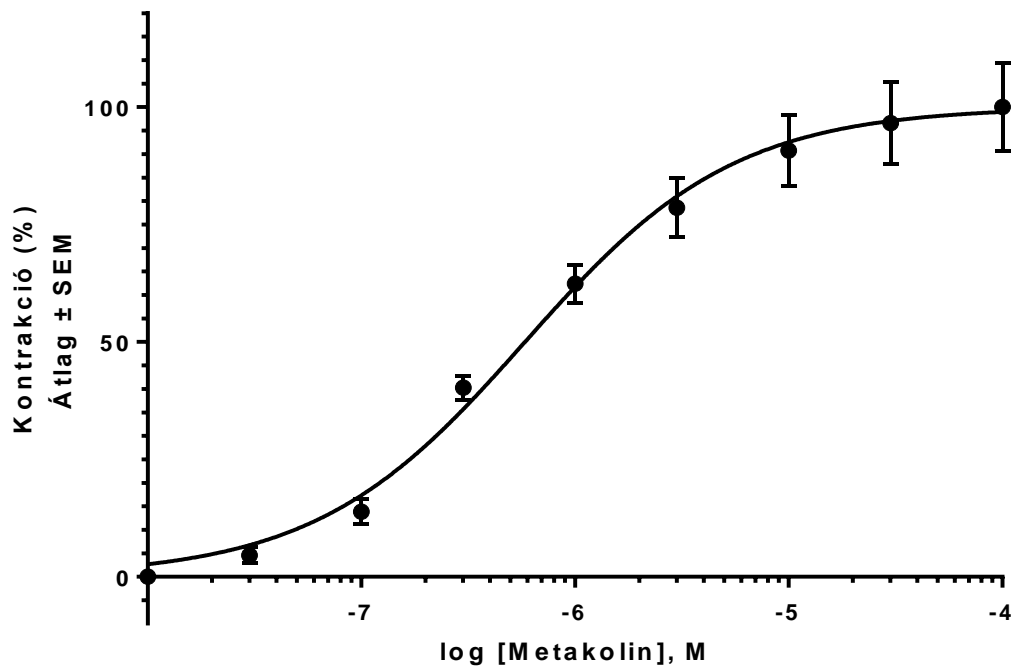
A második előkísérletben a hisztamin dózisainak emelésével a következő kontrakció maximum értékeket és szórásokat kaptuk: $3,16 \pm 0,60$; $3,94 \pm 1,00$; $5,59 \pm 1,81$; $7,77 \pm 2,40$; $9,81 \pm 2,78$; $11,31 \pm 3,16$ mN. A hisztamin EC₅₀ értéke 3×10^{-6} M volt. A koncentráció-hatásgörbét a **10. ábra** mutatja.



10 ábra: Tengerimalac trachea preparátumon mért hisztamin koncentráció-hatás görbe. A hisztamin EC₅₀ értékének meghatározásához az egyes dózisok egymásra adásával (kumulatívan) fokoztuk a kontrakció mértékét. EC₅₀ = 3×10^{-6} M.

6.3. Metakolin EC₅₀ értékének meghatározása

A harmadik előkísérletben a metakolin EC₅₀ értékének meghatározásához 9 dózist alkalmaztunk. Az így elődezett kontrakció maximuma és szórása 0,04±0,10; 0;61±0,59; 1,75±0;92; 5,01±0,88; 7,75±1,43; 9,75±2.17; 11,25±2.66; 11,98±3,03 12,40±3,28 mN volt. Ezen értékek alapján készített koncentráció-hatás görbét a **11. ábra** mutatja. A szoftver segítségével meghatároztuk a metakolin EC₅₀ értéket, amely 5×10^{-7} M volt.



11. ábra: Tengerimalac trachea preparátumon mért metakolin koncentráció-hatás görbe. A metakolin EC₅₀ értékének meghatározásához az egyes dózisok egymásra adásával (kumulatívan) fokoztuk a kontrakció mértékét. EC₅₀= 5×10^{-7} M.

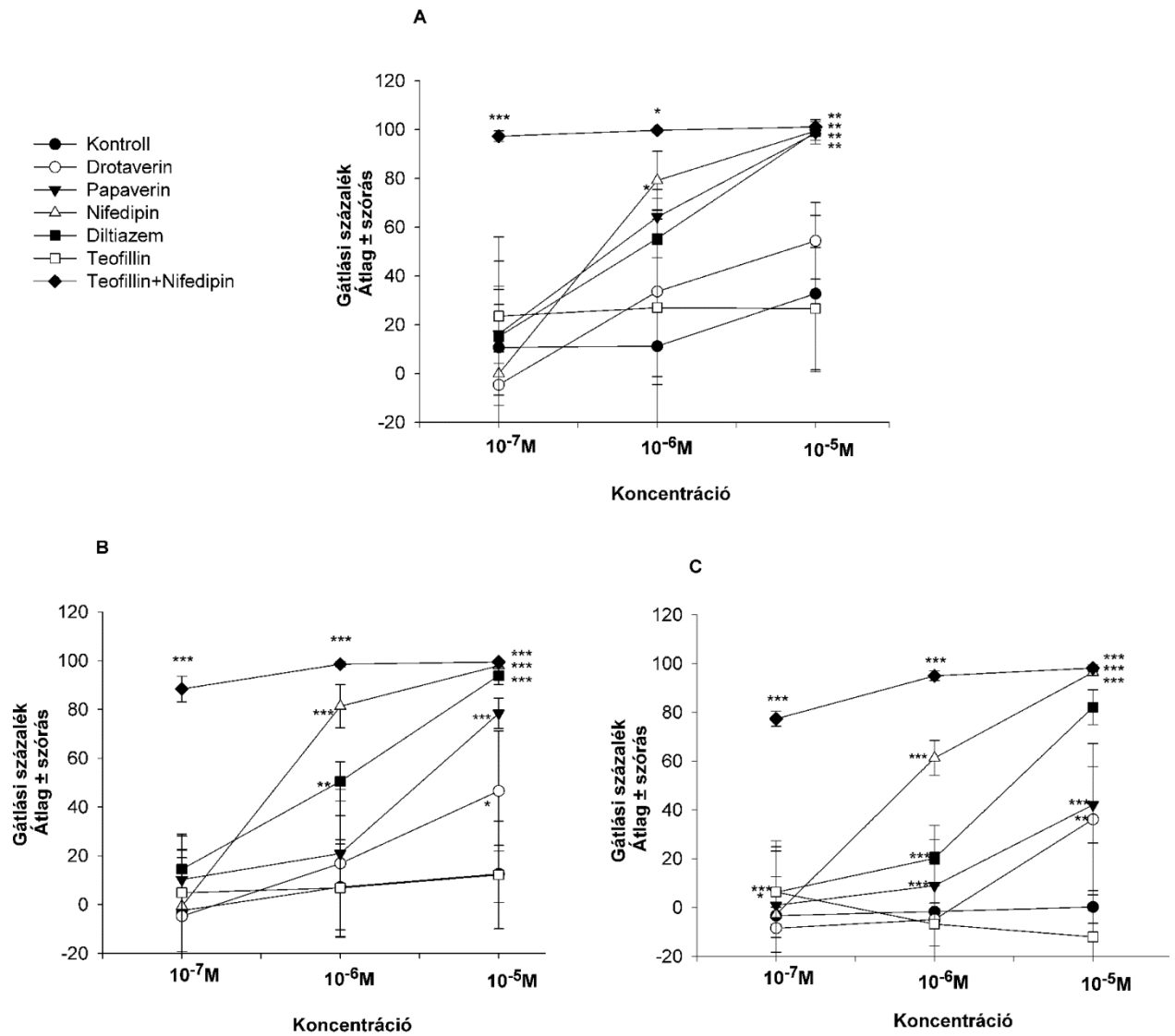
6.4. Drotaverin hatásának vizsgálata KCl kiváltotta kontrakción

A drotaverin L-VOCC-ra kifejtett hatását először magas KCl koncentrációval kiváltott légúti simaizom kontrakción vizsgáltuk. A KCl-ot, mint konstriktor ágenszt azért választottuk ki, mert jól ismert, hogy 10-40 mM KCl érték képes depolarizálni a légúti simaizomot (Foster és mtsai, 1983). A KCl depolarizáció L-VOCC-n keresztüli Ca^{2+} infuxot vált ki, amelynek következtében megnő a $(\text{Ca}^{2+})_i$ és kontrakcióhoz vezet (Karaki és mtsai 1984). Tehát a KCl kiváltotta simaizom kontrakció bizonyítottan L-VOCC csatorna aktiváláson keresztül okoz légúti simaizom kontrakciót. A simaizom kontrakció mértéke arányos a KCl koncentrációjával. Azok az anyagok (kalcium-blokkolók), amelyek gátolják a légúti simaizomban a L-VOCC-n keresztüli Ca^{2+} beáramlást (influxot) simaizom relaxációt okoznak az elektromechanikai kapcsolat gátlásán keresztül. A hipotézisünk az volt, hogy amennyiben a drotaverin képes megakadályozni a L-VOCC keresztüli Ca^{2+} influxot, akkor hasonlóan fog viselkedni, mint a kalcium-csatorna blokkolók és gátolni fogja a KCl kiváltotta légúti simaizom kontrakciót. Ennek érdekében a drotaverin hatását referencia anyagokkal hasonlítottuk össze. Az anyagokat irodalmi adatok alapján választottuk ki, ezek simaizom relaxáló hatásmechanizmusát vettük alapul.

A referencia anyagok a következők voltak:

- L-VOCC gátlására használt anyagok: nifedipin, diltiazem
- PDE gátlására használt anyag: teofillin
- L-VOCC és PDE gátlószer egyben: papaverin, nifedipine + teofillin keverék

Mind a drotaverint, mind a referencia anyagokat három koncentrációban alkalmaztuk: 10^{-7}M , 10^{-6}M és 10^{-5}M . Az eredményeket **12. ábrán** mutatom be, amely a koncentráció-gátlási százalék függvényében összegzi a kapott adatokat 20 mM (A), 30 mM (B) és 50 mM (C) KCl által kiváltott kontrakción.



12. ábra: A vizsgálati anyagok hatása a KCl kiváltotta légúti simaizom trachea kontrakcióra. A kísérletet normál Krebs-Henseleit oldatban végeztük, a kontrakciót 20 mM (A), 30 mM (B) és 50 mM (C) KCl-al váltottuk ki. Az egyes értékek az átlagot és a szórást jelölik n=8 mintaszámmal, míg a kontroll értékek az összesített kontroll értékek átlagát ábrázolják. *P<0,05 **P<0,01 és ***P<0,001.

A **12. ábra** jól szemlélteti, hogy a nifedipin és diltiazem koncentrációfüggő módon csökkentette a kontrakciót mindhárom KCl dózisonál. A 10^{-5} M koncentrációban a nifedipin és diltiazem is képes volt a kontrakció kialakulásának teljes gátlására, bizonyítva ezzel, hogy a kísérleti protokoll egyértelműen L-VOCC függő. A drotaverin esetében sikerült kimutatnunk, hogy képes az L-VOCC-n keresztül kiváltott kontrakciót koncentrációfüggő módon gátolni, mind 20, 30 és 50 mM-os KCl esetében (**12. ábra**). A PDE gátló hatás mellett L-VOCC blokkoló szintén izokinolin származék papaverin hasonlóan viselkedett a drotaverinhez, gyengébbnek bizonyult a nifedipinnél és a diltiazemnél, de mégis koncentrációfüggő módon csökkentette a KCl kiváltotta simaizom kontrakciót. A **12. ábráról** leolvasható, hogy a PDE gátló teofillin koncentrációját emelve nem volt képes dózis-függő módon relaxálni a trachea simaizom preparátumokat egyik KCl kontrakció esetében sem. A nifedipin + teofillin keverék viszont kimagasló hatáserősséget mutatott mind a három KCl dózisonál kiváltott kontrakcióra vonatkozóan.

A két L-VOCC blokkoló és a szintén három eltérő szerkezetű PDE gátló szer EC_{50} értékeinek meghatározását 20, 30 és 50 mM KCl dózisokra vonatkozóan **2. táblázatban** mutatom be.

2. táblázat: A vizsgált anyagok EC_{50} értékei (mM) KCl kiváltotta trachea kontrakción.

	20 mM KCl	30 mM KCl	50 mM KCl
Drotaverin	9,2	>10	>10
Papaverin	0,6	5,8	>10
Nifedipin	0,6	0,6	0,7
Diltiazem	0,8	4,4	5,7
Teofillin	> 10	> 10	> 10
Teofillin+ Nifedipin	< 0,1	< 0,1	< 0,1

6.5. Drotaverin hatásának vizsgálata intracelluláris Ca^{2+} raktárak újratöltődésére

Ezekben a kísérletekben arra kerestük a választ, hogy a drotaverin gátolja-e az L-VOCC-n keresztül megvalósuló Ca^{2+} újratöltődési mechanizmust. A Ca^{2+} raktárak kiürítéséhez hisztamint és metakolint használtunk EC_{50} koncentrációban.

Normál Ca^{2+} tartalmú Krebs-Henseleit oldatban 3×10^{-6} M hisztaminnal és 5×10^{-7} M metakolinnal reprodukálható erősségű kontrakciót váltottunk ki. A két agonista által előidézett EC_{50} kontrakció értékei, normál Krebs-Henseleit oldatban, hasonlóan bizonyultak ($11,9 \pm 3,2$ mN; $n=43$ és $10,4 \pm 2,8$ mN, $n=32$). A normál Krebs-Henseleit oldatot lecserélve Ca^{2+} mentes Krebs-Henseleit oldatra, a hisztamin vagy a metakolin, mosással elválasztott, egymást követő beadása a kontrakció erősségének fokozatos csökkenését eredményezte normal Krebs oldatban mért kontrakcióhoz képest, amelyet az értékelés során 100%-nak tekintettünk. Hisztamin esetében az egymást követő, 1-től a 3. beadásig mért kontrakciós értékek rendre, $70,7\% \pm 14,8\%$; $22,9\% \pm 25,1\%$, és $3,0\% \pm 6,3\%$ ($n=43$), míg metakolinnál rendre $76,2\% \pm 12,4\%$; $13,3\% \pm 16,8\%$ és $0,4\% \pm 1,1\%$ ($n=32-43$) volt.

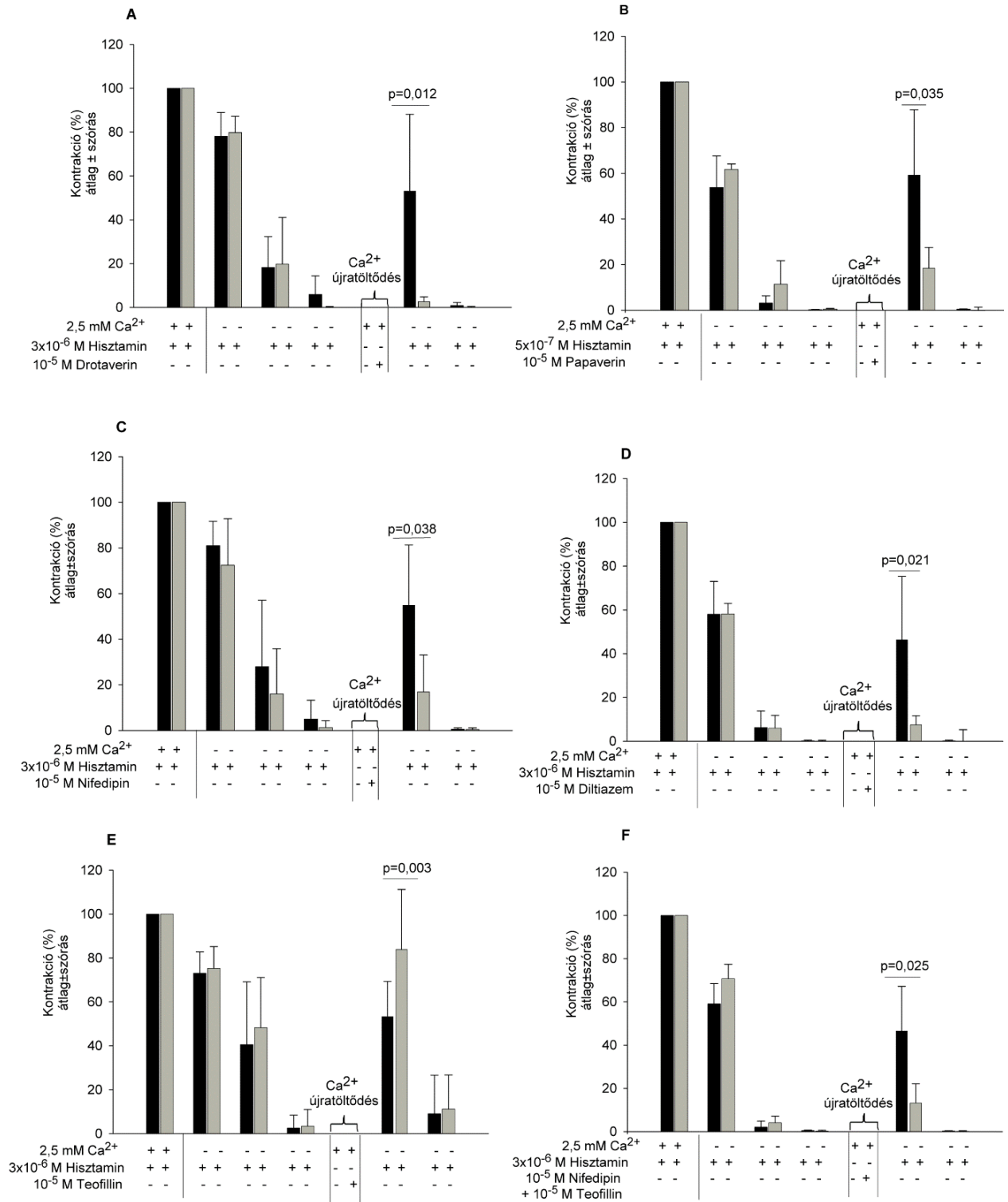
Hasonlóan az első Ca^{2+} mentes közegben mért reakcióhoz, a kontrakciós maximum itt is beadásról-beadásra folyamatosan csökkent (**3. táblázat, 6. oszlop**). Azonban szemben az első Ca^{2+} -mentes közegben mért első kontrakcióhoz, a második Ca^{2+} -mentes oldatban az első agonista beadás kisebb kontrakciós választ adott (**3. táblázat**). Ugyanez igaz, ha a második agonista beadás kiváltotta válaszokat hasonlítjuk az első beadás által kiváltott válaszokhoz (**3. táblázat**).

3. táblázat: Tengerimalac légső preparátumon hisztamin (3×10^{-6} M), vagy metakolin (5×10^{-7} M) kiváltott kontrakciók maximumának százalékos értékei (átlag \pm SD (n=32-43)).

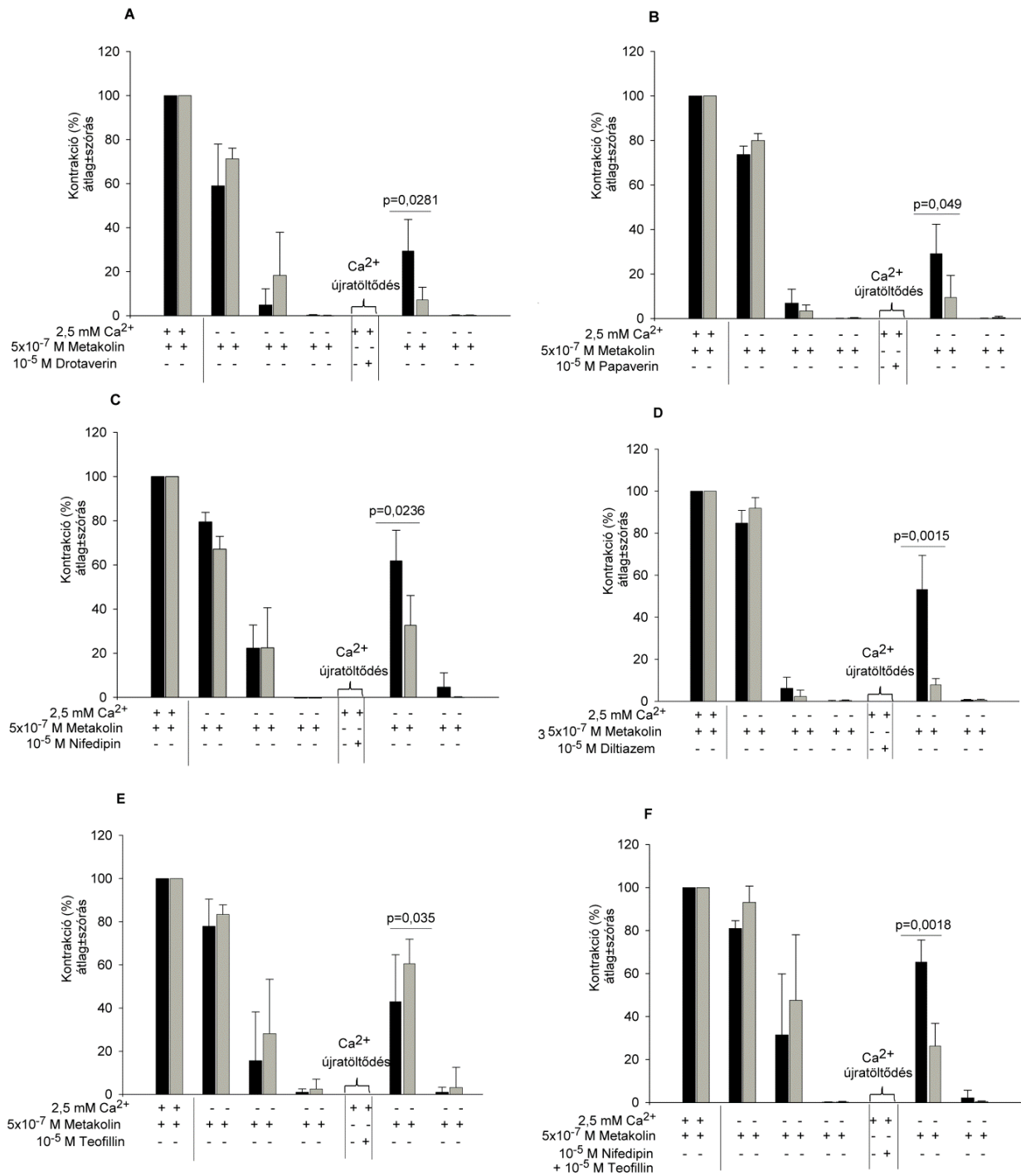
Agonista	Normál KH oldat		Ca ²⁺ mentes KH oldat			Ca ²⁺ mentes KH oldat	
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
Hisztamin	92,5 \pm 8,0	100*	70,7 \pm 14,8	22,9 \pm 25,1	3,0 \pm 6,3	52,7 \pm 25,4	3,1 \pm 10,1
Metakolin	89,2 \pm 5,8	100*	76,2 \pm 12,4	13,3 \pm 16,8	0,4 \pm 1,1	42,0 \pm 21,1	1,2 \pm 2,9

* 100% kontrakciós értékek a normál Krebs-Henseleit oldatban mért $2 \cdot 3 \times 10^{-6}$ M hisztamin vagy $2 \cdot 5 \times 10^{-7}$ M metakolin hatását tekintettük.

Miután bizonyítottuk, hogy Ca²⁺ mentes oldatban sorozatos agonista adagolás által kiürített intracelluláris Ca²⁺ raktárak képesek normál extracelluláris Ca²⁺ szint mellett újra tölteni, a következő lépésben azt kívántuk bizonyítani, hogy az intracelluláris Ca²⁺ raktárak újratelítődésében az L-VOCC-nek meghatározó szerepet játszik. Ennek bizonyítására a Ca²⁺ mentes közegben harmadszor beadott agonista kimosása után a Ca²⁺ újratöltődéshez használt Krebs-Henseleit oldat drotaverint vagy a következő referencia anyagok egyikét tartalmazta: papaverint, nifedipint, diltiazemet, teofilint, teofilin-nifedipin keveréket. Az így kapott eredményeket hisztamin esetében a **13. ábrán**, míg metakolin esetében a **14. ábrán** összegzem.



13. ába: Hisztamin-kiváltott tengerimalac izolált trachea kontrakció normál és Ca²⁺-mentes Krebs-Henseleit oldatban. A 30 perces újratöltődés alatt a kezelt preparátumok n=4-12, a vizsgálati anyagokból 10⁻⁵ M dózist kaptak: drotaverin (A), papaverin (B), nifedipin (C), diltiazem (D), teofilin (E), illetve teofilin+nifedipin (F).



14. ábra: Metakolin-kiváltott tengerimalac izolált trachea kontrakció normál és Ca²⁺-mentes Krebs-Henseleit oldatban. A 30 perces újratöltés alatt a kezelt preparátumok n=4-12, a vizsgálati anyagokból 10⁻⁵ M dózist kaptak: drotaverin (A), papaverin (B), nifedipin (C), diltiazem (D), teofilin (E), illetve teofilin + nifedipin (F).

Az L-VOCC blokkoló nifedipin (**13. C, 14. C ábra**,) vagy diltiazem (**13. D, 14. D**) hozzáadása a raktárak újratöltését végző Ca^{2+} tartalmú Krebs-Henseleit oldathoz képes volt csökkenteni az agonista kiváltotta kontrakciót az újratöltődési lépést követően Ca^{2+} mentes oldatban. Ez azt mutatja, hogy mind a két L-VOCC blokkoló képes, a konstriktor agonistától függetlenül is, a Ca^{2+} raktárak újratöltődését gátolni. A nem szelektív PDE gátló teofillin, szemben az L-VOCC blokkolókkal, nem volt képes megakadályozni az agonsita kiváltotta kontrakciót (**13. E és 14. E ábra**), inkább fokozta a Ca^{2+} újratöltődést, mint gátolta azt. A nifedipin + teofillin kombinációja viszont gátolta mind a metakolin mind a hisztamin kiváltotta kontrakciót az újratöltődést követően a Ca^{2+} mentes oldatban, amelyet a **12. F és 13. F ábra** is mutat. A két PDE blokkoló izokinolin származék drotaverin és a papaverin hatása inkább az L-VOCC blokkoló nifedipinhez és diltiazemhez volt hasonló, mivel képes volt a Ca^{2+} újratöltődést követő kontrakció gátlására, ahogy az **13. A, B és 14. A, B ábra** szemlélteti. Az újratöltődés mértékének százalékos értékeit az **4. táblázatban** összegeztem. Ez alapján megállítható, hogy a hisztamin által kiváltott kontrakció esetében a hatáserősség sorrend drotaverin >diltiazem >teofillin + nifedipin >nifedipin >papaverin >teofillin volt, amíg metakolinnal kiváltott kontrakció esetében drotaverin >diltiazem >papaverin >teofillin + nifedipin >nifedipin >teofillin volt.

4. táblázat: tengerimalac légső preparátum Ca^{2+} újratöltődést követő első hisztamin (3×10^{-6} M), vagy metakolin (5×10^{-7} M) kontrakció százalékos értékei (átlag \pm szórás, n=4-8).

Kísérleti anyagok	Drotaverin 10^{-5} M	Papaverin 10^{-5} M	Nifedipin 10^{-5} M	Diltiazem 10^{-5} M	Teofillin 10^{-5} M	Teofillin+ Nifedipin 10^{-5} M
Hisztamin	2,66 \pm 2,17	18,37 \pm 9,1 6	16,90 \pm 16,16	7,46 \pm 4,15	83,90 \pm 27,28	13,22 \pm 8,86
Metakolin	7,17 \pm 5,78	9,50 \pm 9,86	32,63 \pm 13,50	7,78 \pm 3,06	60,59 \pm 11,32	26,26 \pm 10,53

6.6. CaCl₂-kiváltotta kontrakció vizsgálata agonistát tartalmazó Ca²⁺ mentes oldatban

A Ca²⁺ raktárak kiürítése és újratöltése során kapott eredményeink azt mutatták, hogy az L-VOCC-n keresztül megvalósuló újratelítődést a drotaverin és a szerkezetileg rokon papaverin képes volt gátolni. A drotaverin funkcionális L-VOCC blokkoló hatását tovább bizonyítandó, a következő kísérleti lépésben olyan funkcionális modellt terveztünk, amelynél a Ca²⁺ újratelítődés kinetikáját (folyamatát) agonista jelenlétében végig tudtuk követni. Hipotézisünk az volt, hogy a kiürített SR feltöltődésében szerepet játszó L-VOCC csatornákon keresztüli Ca²⁺ influx mértékét és sebességét agonista jelenlétében nyomon tudjuk követni a kontrakciós erő kialakulásának regisztrálásával. A CaCl₂ kontrakció kialakulásának sebessége mellett értékeltük a kontrakciós erő maximumát is.

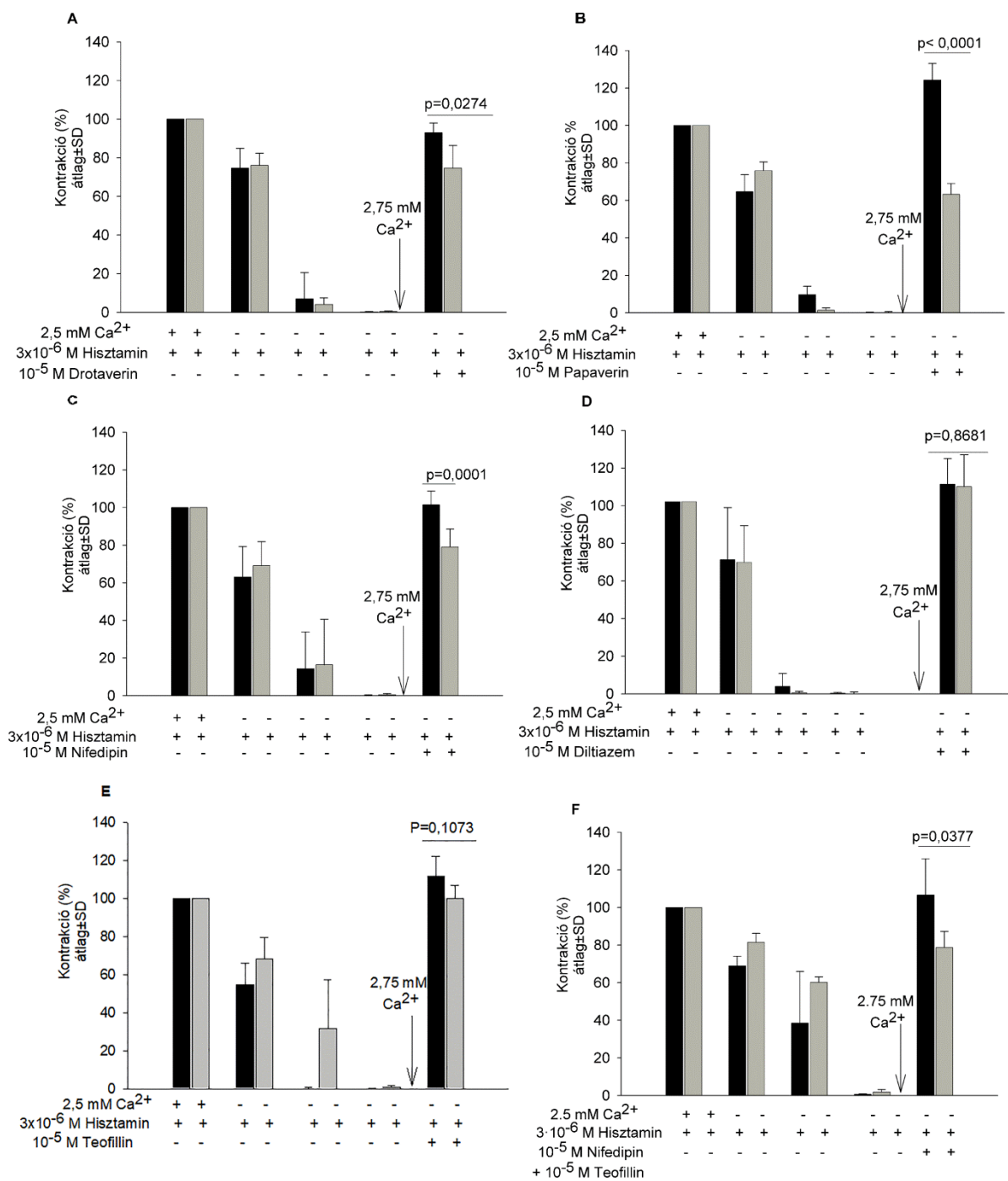
Az L-VOCC blokkoló nifedipin a kontroll értékhez képest szignifikánsan csökkentette a CaCl₂-al kiváltott kontrakció nagyságát, már 10⁻⁵ M-os koncentrációban, mind hisztamin, mind metakolin jelenlétében. A nifedipin hatása nem mutatott agonista specificitást, mivel jelenlétében a hisztamin kontrakció maximuma csupán 20,9% (**17. A ábra**), illetve metakolin kontrakció maximuma 23,5%-al csökkent (**17. B ábra**). A nifedipinnel ellentétben a diltiazem agonista specifikus hatást mutatott 10⁻⁵ M koncentrációban, mivel a hisztamin kiváltotta CaCl₂ kontrakciót nem volt képes szignifikánsan csökkenteni, sőt inkább 7,8%-al növelte azt (**17. A ábra**), szemben a metakolin kiváltotta kontrakcióval, amelyet 35,7%-al csökkentett (**17. B ábra**).

Miután kimutattuk, hogy a leírt kísérleti körülmények közötti jelenségek az L-VOCC függő folyamatok következményei, az L-VOCC blokkolók helyett drotaverint, papaverint, vagy PDE gátló teofillint használtunk. Ezen kísérlet során a kapott eredményeket a **15. A** és **16. A** ábra mutatja, melyen papavaverinnel (**15. B, 16. B ábra**), nifedipinnel (**15. C, 16. C ábra**), diltiazemmel (**15. D, 16. D ábra**), teofillinnel (**15. E, 16. E ábra**) és nifedipin + teofillin keverékével hasonlítottuk össze (**15.F, 16. F ábra**) a CaCl₂ bedásának hatására kiváltott kontrakció mértékét.

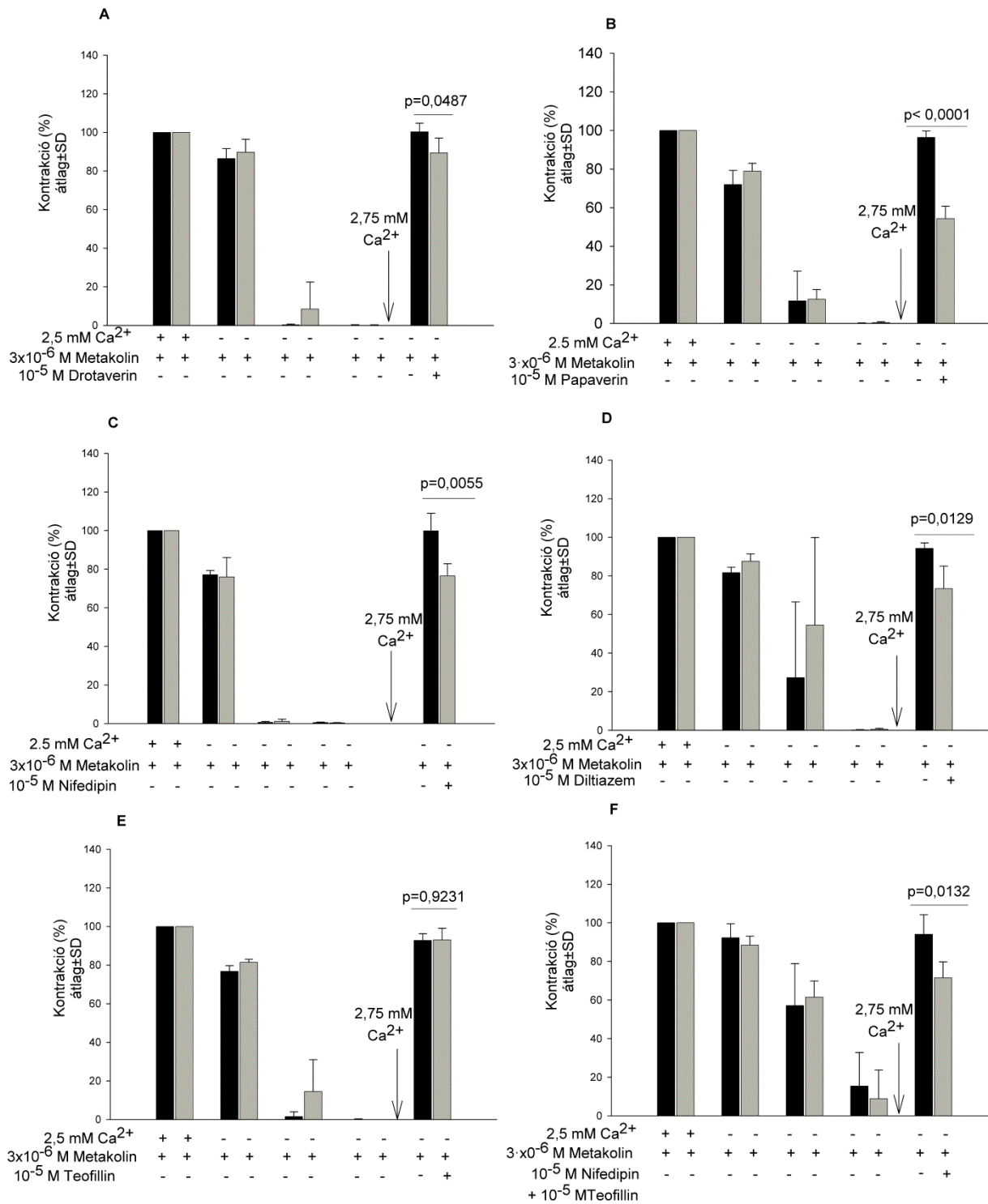
A drotaverin 10⁻⁵ M-os dózisban hasonlóan viselkedett, mint az L-VOCC-t blokkoló nifedipin. Mindkét agonista jelenlétében gátolta a CaCl₂ kiváltotta símaizom kontrakciót. Annak ellenére, hogy a drotaverin gátló hatás mértékében a hisztamin jelenlétében tűnt nagyobbak a kontroll értékekhez képesti csökkenés mégis, a metakolin jelenlétében bizonyult statisztikailag szignifikánsak (**17. A ábra**). A papaverin az ismert PDE és L-VOCC

gátló hatás miatt a várakozásoknak megfelelően viselkedett hisztamin jelenlétében, a CaCl_2 kiváltotta a kontrakciót 36,8%-al, (**17. A ábra**), míg metakolin jelenlétében 45,7%-al csökkentette (**17. B ábra**).

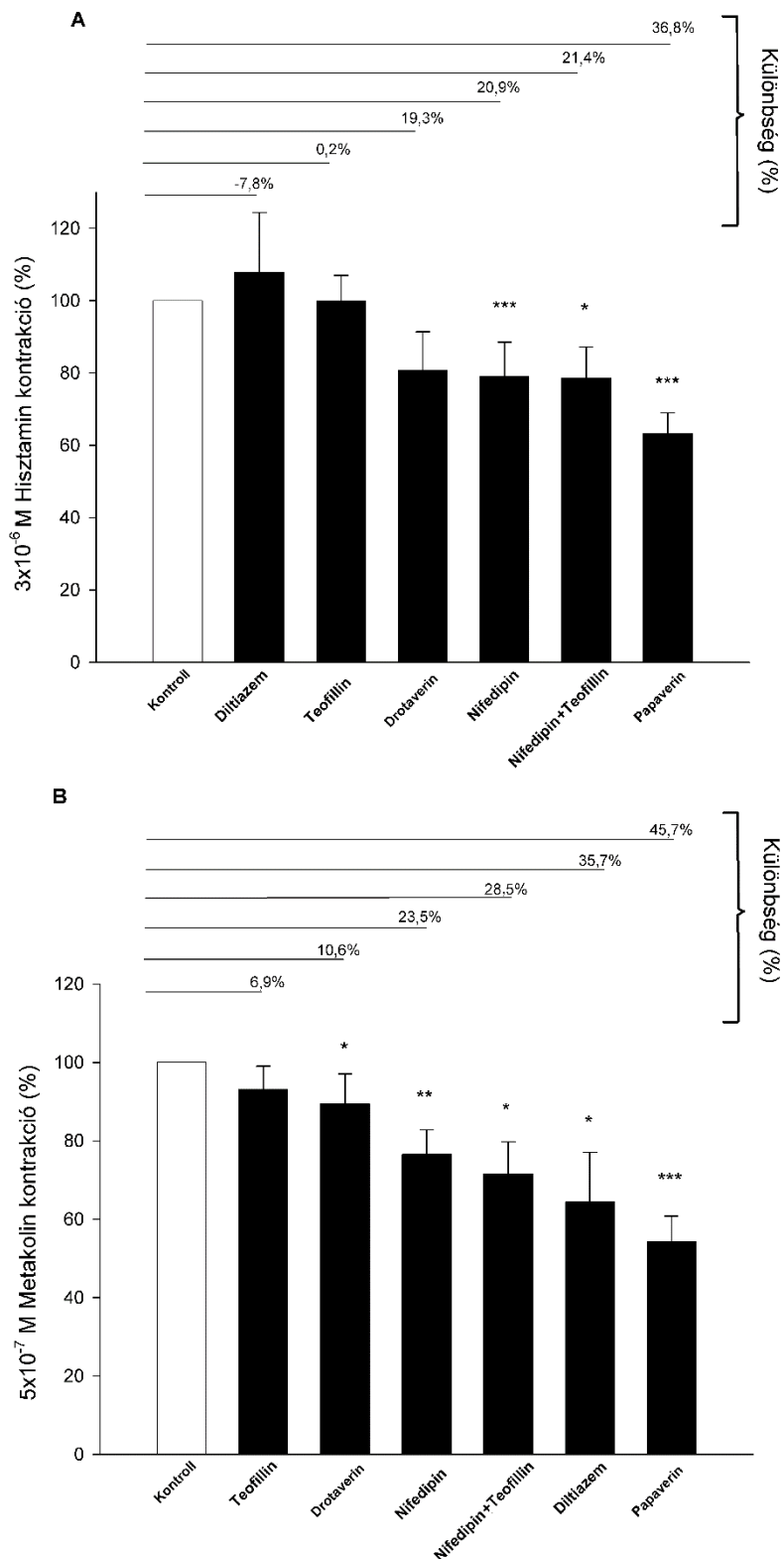
A PDE gátló teofillin nem volt képes jelentősen csökkenteni egyik agonista jelenlétében sem a CaCl_2 kiváltotta kontrakció maximum értékét. A hisztamin jelenlétében 0,2%-al, a metakolin jelenlétében 6,9%-al csökkentette a CaCl_2 kiváltotta kontrakciót (**17. A, B**). A teofillin + nifedipin keverék gátolta a CaCl_2 kontrakciót mind a hisztamin, mind a metakolin jelenlétében. A keverék hatáserőssége összemérhető volt a drotaverinével. A **17. A** és **17. B ábra** alapján megállapítható, hogy a hisztamint tartalmazó oldatban a diltiazem <teofillin <drotaverin <nifedipin <nifedipin + teofillin <papaverin, míg a metakolint tartalmazó oldatban teofillin <drotaverin <nifedipin <nifedipin + teofillin <diltiazem <papaverin volt a hatáserősség sorrend.



15. ábra: Tengerimalac izolált trachea kontrakció hisztamin tartalmú Krebs-Henseleit oldatban, változó extracelluláris Ca²⁺ koncentráció mellett (n=4-12). A vizsgálati anyagok 10⁻⁵ M koncentrációban voltak jelen az oldatban: drotaverin (A), papaverin (B), nifedipin (C), diltiazem (D), teofillin (E), vagy teofillin + nifedipin (F).



16. ábra: Tengerimalac izolált trachea kontrakció metakolin tartalmú Krebs-Henseleit oldatban, változó extracelluláris Ca²⁺ koncentráció mellett. (n=4-12). A vizsgálati anyagok 10⁻⁵ M koncentrációban voltak jelen az oldatban: drotaverin (A), papaverin (B), nifedipin (C), diltiazem (D), teofilin (E), vagy teofilin + nifedipin (F).

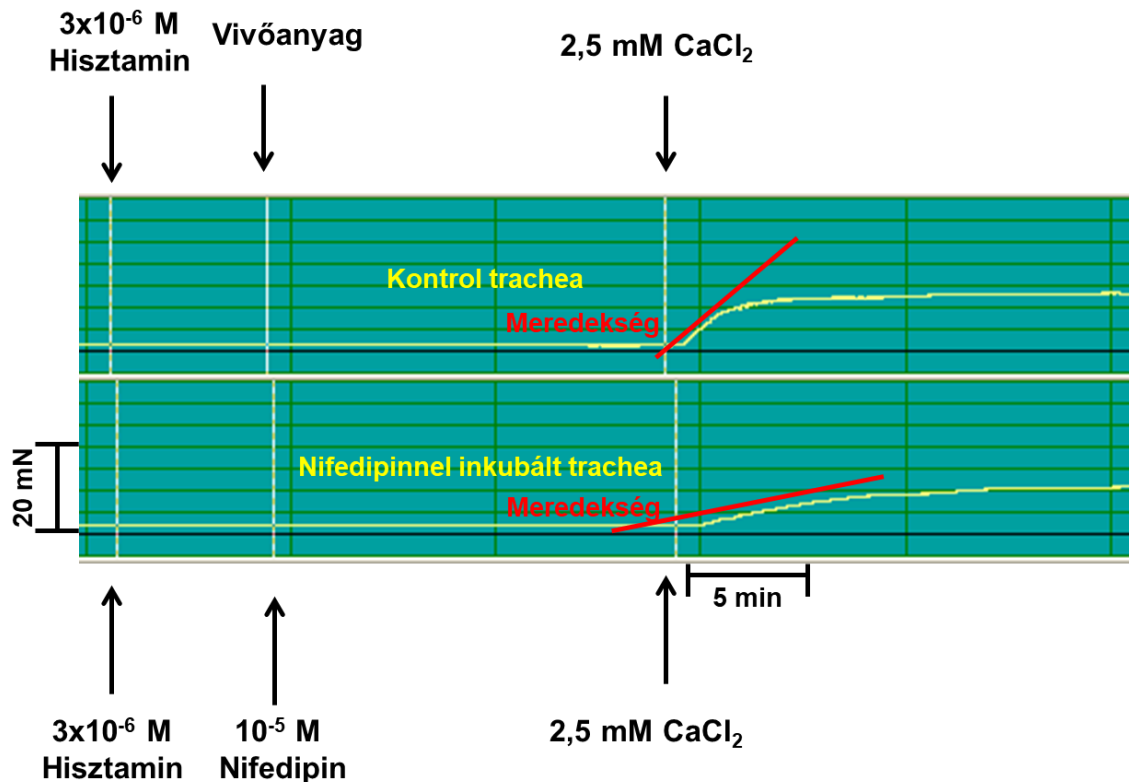


17. ábra: A CaCl_2 kiváltotta tengerimalac trachea kontrakció maximum értékei 3×10^{-6} M hisztamin (A) vagy 5×10^{-5} M metakolint (B) tartalmazó Ca^{2+} mentes Krebs-Henseleit oldatban. Az ábrán az egyes oszlopokat a gátló hatás mértéke alapján vannak sorbarendezve. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

6.7. A CaCl_2 kiváltotta kontrakció meredekségének vizsgálata

Kísérleteink során megfigyeltük, hogy a Ca^{2+} raktárak kiürítése után, agonista jelenlétében, a CaCl_2 kiváltotta kontrakció kialakulásának a meredeksége eltér a kontroll és az L-VOCC blokkoló anyag jelenlétében.

Az általunk megfigyelt csoportok közötti különbséget szemlélteti a **18. ábra**. Láthatóan csökken a nifedipin hatására, a CaCl_2 kontrakciós görbe meredeksége és a kontrakció maximuma szemben a kontroll preparátumával.



18. ábra: CaCl_2 kiváltotta tengerimalac trachea kontrakció Ca^{2+} depletált trachea preparátumon, Ca^{2+} -mentes, hisztamin tartalmú Krebs-Henseleit oldatban. A nifedipinnel való inkubálást követően a kontrakció kialakulásának kinetikája (meredekség) jelentősen eltér a kontroll preparátumétól.

Feltételeztük, hogy a meredekségek közötti különbség háttérében az L-VOCC működésének a gátlása rejlik. Ennek igazolására első lépésben L-VOCC gátló anyagok használata nélkül meg kellett bizonyosodnunk arról, hogy a normál Krebs-Henseleit oldatban a hisztamin, illetve metakolin által kiváltott kontrakció meredeksége nem tér el a Ca^{2+} raktárak kiürítését követően agonista jelenlétében a CaCl_2 -vel kiváltott kontrakció meredekségétől. Ezért mind a kontroll, mindig a CaCl_2 kontrakciós görbék felszálló meredek ágára egyenest illesztettünk, majd összehasonlítottuk a meredekség értékeket. A kapott eredményeket a **5. táblázatban** mutatom be.

5. táblázat: Normál vagy Ca^{2+} mentes oldatban CaCl_2 kiváltott hisztamin (3×10^{-6} M), vagy metakolin (5×10^{-7} M) kontrakció maximum és meredekség értékei (átlag \pm szórás, n=32).

	Hisztamin			Metakolin		
	Kontroll	CaCl_2	p=	Kontroll	CaCl_2	p=
Kontrakció (mN)	9,55 \pm 2,84	10,20 \pm 2,84	0,30	11,33 \pm 2,49	10,88 \pm 2,29	0,95
Meredekség ($\times 10^{-3}$)	1,97 \pm 0,88	1,33 \pm 0,62	0,06	1,58 \pm 0,53	1,45 \pm 0,62	0,14

Az **5. táblázat** kontrakció sora jól mutatja, hogy normál Krebs-Henseleit oldatban hisztamin hatására kialakult kontroll kontrakció maximum értéke ugyan alacsonyabbnak bizonyult a CaCl_2 hatására kialakult kontrakció maximumánál, de sem az eltérés, sem a kontrakció kialakulásának a meredeksége nem szignifikáns. A metakolin estében is hasonló tapasztaltunk, mivel a normál Krebs-Henseleit oldatban kiváltott kontrakció maximuma és meredeksége nagyon hasonlónak bizonyult az agonista tartalmú Ca^{2+} mentes oldatban, CaCl_2 hozzáadásának a segítségével kiváltott kontrakcióval. Ebből arra következtettünk, hogy a kapott eredményeket felhasználhatjuk annak a vizsgálatára, hogy a drotaverin, illetve a referenciaként alkalmazott anyagok képesek-e a kontrakció kinetikájára hatást gyakorolni. A CaCl_2 kontrakció meredekségére gyakorolt hatás kialakulásában a drotaverin, papaverin, nifedipin, teofillin és teofillin + nifedipint tanulmányoztuk. A regisztrált kontrakciós erő-idő görbék felszálló szárára egyenest illesztettünk, majd meghatároztuk az egyenesek meredekségét minden egyes vizsgált anyagra vonatkozóan. Az így kapott meredekség értékeket a **6. táblázatban** foglaltam össze.

6. táblázat: A CaCl₂ beadását követő kontrakció kialakulásának meredeksége hisztamint (3x10⁻⁶M), vagy metakolint (5x10⁻⁷ M) tartalmazó szervfürdőben tengerimalac légső preparátumon (n=4-8).

	CaCl ₂ hozzáadása hisztamint tartalmazó Ca ²⁺ mentes KH-ba (x10 ³)	p<	CaCl ₂ hozzáadása metakolint tartalmazó Ca ²⁺ mentes KH-ba (x10 ³)	p<
kontroll	9,7±3,2		19,6±5,9	
10⁻⁵M Drotaverin	1,2±1,1	0,001	3,5±2,5	0,01
kontroll	19,1±1,3		11,8 ±4,6	
10⁻⁵M Papaverin	1,1±0,5	0,05	0,8±0,3	0,01
kontroll	11,4±4,2		10,1±3,3	
10⁻⁵M Nifedipin	1,1±0,4	0,001	1,0±0,5	0,01
kontroll	14,5±5,0		13,7±2,4	
10⁻⁵M Diltiazem	2,4±1,1	0,001	0,7±0,3	0,001
kontroll	10,6±3,6		12,6±6,4	
10⁻⁵M Teofillin	13,9±4,1	n.sz.*	8,4±1,4	n.sz.
kontroll	13,9±3,3		17,9 ± 9,4	
10⁻⁵M Teofillin +10⁻⁵M Nifedipin	0,9 ±0,3	0,001	0,9±0,2	0,05

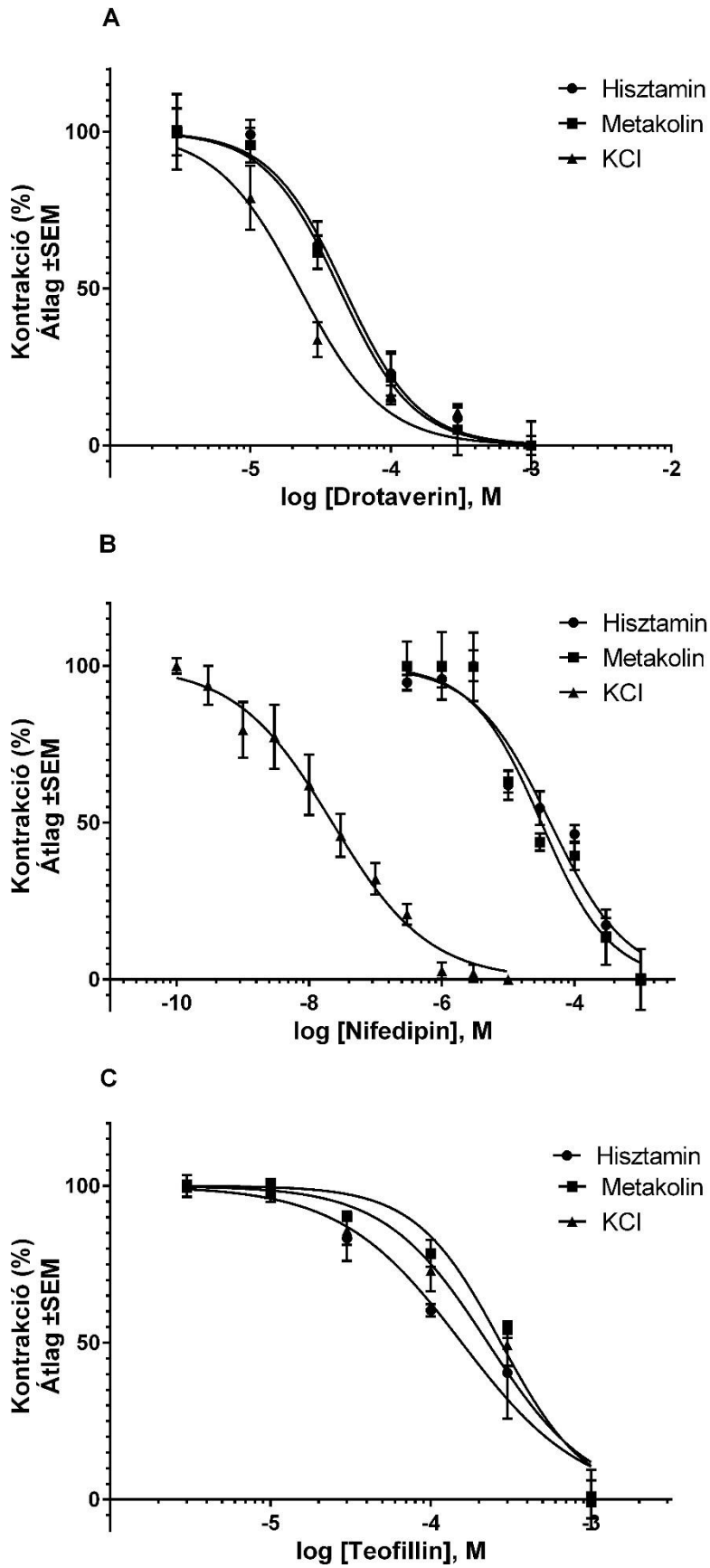
*n.sz.: nem szignifikáns

A két L-VOCC blokkoló nifedipin és diltiazem esetében a CaCl₂ kontrakciós görbe meredekségének csökkenését tapasztaltuk, azt valószínűsítve, hogy a Ca²⁺ ionok az extracelluláris térből az L-VOCC-eken keresztül áramlanak az intracelluláris térbe, a Ca²⁺ depletált preparátumon, simaizom konstriktor agonista jelenlétében. A **6. táblázatból** látható, hogy az L-VOCC blokkolók a kontrollhoz képest szignifikáns hatással voltak nemcsak a kontrakció maximumára, hanem a kontrakciós erő időbeli kialakulására (meredekség) is. Az általunk megfigyelt jelenség nem mutatott agonista függő hatást. A PDE gátló teofillin a kontrakció maximumát nem volt képes jelentősen befolyásolni, ezért azt vártuk, hogy a meredekségére sem lesz hatással. A hipotézisünk beigazolódott, mivel sem hisztamin, sem metakolint tartalmazó szervfürdőben sem volt szignifikáns hatással a kontrakció kialakulásának meredekségére, inkább segítette, mint gátolta a CaCl₂ által kiváltott kontrakciót (**6. táblázat**). A drotaverin és a papaverin két L-VOCC blokkolóhoz hasonlóan mind a két agonista esetében szignifikánsan csökkentette a Ca²⁺ töltődés meredekségét.

6.8. Összehúzott preparátum ernyesztésének vizsgálata

Az L-VOCC-n keresztüli Ca^{2+} influxnak szerepe van a légúti simaizom kontrakció fenntartásában (kontraktúra), ezért annak gátlása a már összehúzott preparátumon relaxációt okozhat. Ennek a tesztelése érdekében 20 mM KCl-al, 3×10^{-6} M hisztaminnal, vagy 5×10^{-7} M metakolinnal stabilan fennálló kontrakciót váltottunk ki normál Krebs-Henseleit oldatban. A kontroll kontrakciók értékei $n=12$ -nél a következők voltak: hisztamin: $11,41 \pm 1,72$; metakolin: $9,49 \pm 3,73$; KCl: $9,20 \pm 3,19$. Ezt követően a preparátumoknak a drotaverin, nifedipin, vagy teofillin növekvő dózisaival, kumulatív módon, simaizom ernyesztést váltottunk ki.

A következő lépésben 3×10^{-5} M hisztamin, 5×10^{-6} M metakolin, vagy 20 mM KCl segítségével összehúzott légcső preparátumok szervfürdőjébe a drotaverin, nifedipin, vagy teofillin növekvő dózisait adagoltuk kumulatív módon. Az így kapott koncentráció-hatás görbéket a **19. ábrán** szeretném bemutatni, míg az eredményeket számszerűsítve a **7. táblázatban** foglaltam össze.



19. ábra: Összehúzott légúti simaizom (kontraktura) relaxálása: (A) drotaverin, (B) nifedipin, (C) teofillin alkalmazásával. A simaizom preparátumokat 3×10^{-6} M hisztaminnal, 5×10^{-7} M metakolinnal, vagy 20 mM KCl-al húztuk össze. n=4.

7. táblázat: Hisztaminnal (3×10^{-6} M), metakolinnal (5×10^{-7} M), vagy KCl-al (20 mM) összehúzott légső preparátumoknak ernyesztése során kapott EC_{50} értékek. A koncentráció-hatás görbék meghatározását követően F-próbával hasonlítottuk össze ugyanazon anyag három konstriktoron meghatározott $\log EC_{50}$ értékeit.

	Hisztamin	Metakolin	KCl	P
Drotaverin	$4,7 \times 10^{-5}$	$4,3 \times 10^{-5}$	$2,2 \times 10^{-5}$	0,0008
Nifedipin	$4,3 \times 10^{-5}$	$3,2 \times 10^{-5}$	$2,2 \times 10^{-8}$	<0,0001
Teofillin	$2,3 \times 10^{-4}$	$2,7 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-4}$	0,25

Az alkalmazott kísérleti protokoll L-VOCC függését mutatja, hogy a nifedipin legalább három nagyságrenddel hatékonyabb a KCl fentartotta kontraktúra relaxációjában, mint akár a hisztamin, akár a metakolin kontrakcióval szemben (**7. táblázat**).

Megfigyeltük, hogy a drotaverin az összehúzott tengerimalac légső preparátumot koncentráció és kontrakciós mediátorfüggő módon képes ernyeszteni (**19. A ábra**). Ez a jelenség szintén a drotaverin L-VOCC-ra kifejtett blokkoló hatását támasztja alá, mivel KCl-depolarizáció kiváltotta kontrakción statisztikailag szignifikáns módon legalább kétszer nagyobb hatáserősséget mutatott, mint a hisztaminnal, vagy a metakolinnal összehúzott preparátumon. A relaxáló hatások EC_{50} értékei a **7. táblázatban** foglaltam össze.

Annak ellenére, hogy a nem szelektív PDE gátló teofillin is képes volt mind a három mediátor által kiváltott kontrakciójának ernyesztésére (**19. C ábra**), nem mutatott szignifikáns potenciálbeli különbséget.

6.9. A kontrakció kialakulásának gátlása

A légúti simaizom kontrakciójában és a kontrakció fenntartásában eltérő Ca^{2+} -függő intracelluláris mechanizmusok játszanak szerepet. Az eddig tárgyalt kísérleteinkben az L-VOCC blokkoló referens vegyületek, a teofillin és a drotaverin hatását tanulmányoztuk a már kialakult légúti simaizom kontrakción. Azonban az L-VOCC-k a simaizom kontrakciójában is részt vesznek. Különösen igaz ez a KCl depolarizáció kiváltotta simaizom kontrakcióra. A vizsgálati hipotézisünk szerint a L-VOCC blokkoló hatással rendelkező anyagok minden valószínűség szerint hatékonyabban gátolhatják a KCl kiváltotta kontrakciót, mint a receptor aktivációt követő kontrakcióét.

A simaizom kontrakciót kiváltó ágenseket EC_{50} koncentrációban alkalmaztuk, hogy közel azonos kontrakciós erőt fejtsenek ki. Méréseink eredményeként normál Krebs-Henseleit

oldatban 3×10^{-6} M hisztamin, 5×10^{-7} M metakolin és 20 mM KCl rendre $10,8 \pm 2,9$ mN; $9,6 \pm 2,5$ mN; $8,1 \pm 2,0$ mN (n=12) kontrakciót váltott ki. Azt követően, hogy meghatároztuk az egyes preparátumokon a három mediátor által kiváltott kontrakció maximum értékeit a drotaverin, nifedipin, vagy teofillin növekvő koncentrációi mellett, ismételve váltottunk ki a simaizom kontrakciót hisztaminnal, metakolinnal, vagy KCl-dal. Az eredményeket a **20. ábrán** és a gátló hatások EC_{50} értékeit a **8. táblázat** foglalja össze.

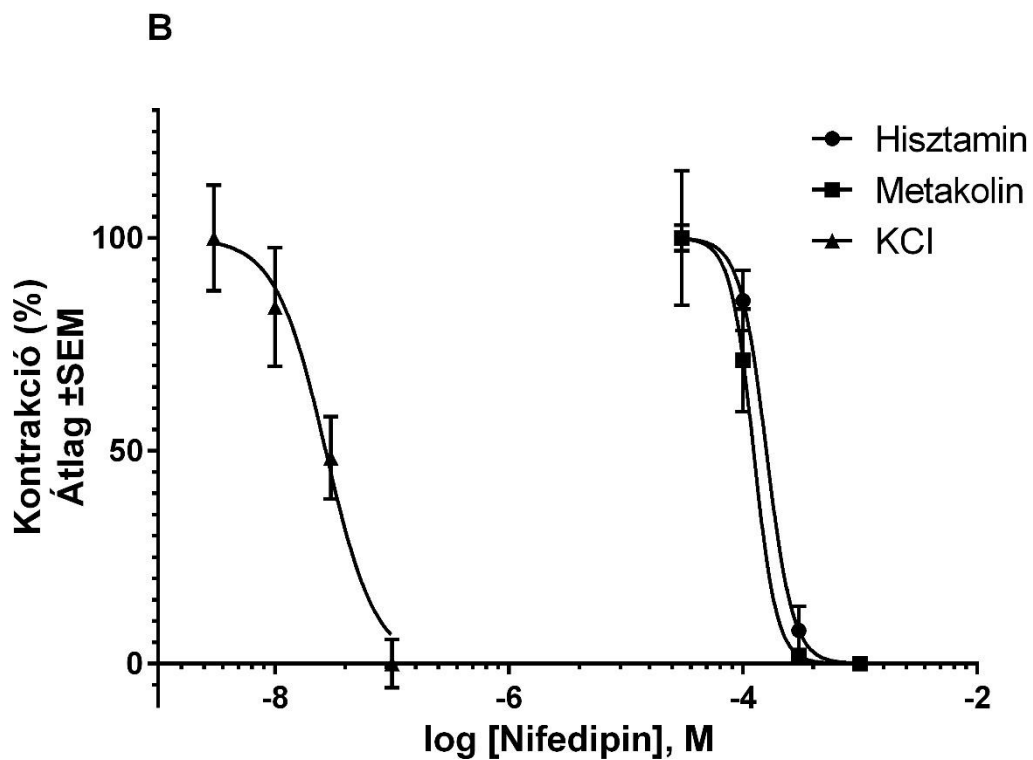
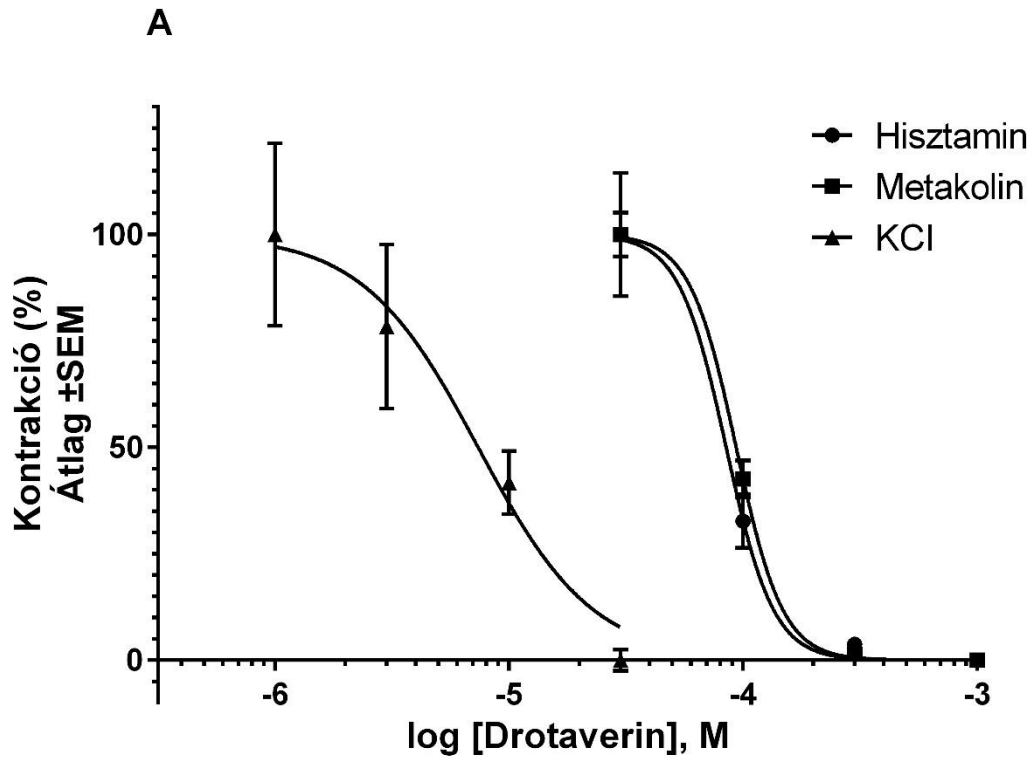
8. táblázat: Hisztamin (3×10^{-6} M), metakolin (5×10^{-7} M), vagy KCl (20 mM) kontrakció gátlása során meghatározott EC_{50} értékek összesítése és statisztikai összehasonlítása (n=4). Statisztikai vizsgálat során F-próbával hasonlítottam össze ugyanazon anyag három konstriktoron meghatározott $\log EC_{50}$ értékeit.

Anyagok	Hisztamin	Metakolin	KCl	p
Drotaverin	$8,5 \times 10^{-5}$	$9,3 \times 10^{-5}$	$7,4 \times 10^{-6}$	< 0,0001
Nifedipin	$1,6 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-4}$	$2,7 \times 10^{-8}$	< 0,0001
Teofillin	* n.a	* n.a	* n.a	* n.a

* A teofillin alacsony hatáserőssége miatt az EC_{50} értéke nem volt meghatározható. n.a. nem alkalmazható.

A nifedipinnel kapott eredmények igazolták, hogy a KCl kiváltotta légúti simaizom kontrakció kifejezetten L-VOCC függő folyamat, míg a hisztamin, vagy a metakolin okozta kontrakció a KCl-hoz képest csak sokkal kisebb mértékben L-VOCC függő. A nifedipin koncentráció-függő módon gátolta mind a három mediátor kiváltotta kontrakciót (**20. B ábra**), de a hatáserőssége négy nagyságrenddel nagyobb volt a 20 mM KCl kiváltotta kontrakció esetében **8. táblázat**. A nifedipinnel kapott eredményeim megfeleltek a kísérleti hipotézissel szemben támasztott várakozásaimnak, amely szerint a protokoll alkalmas szétválasztani az L-VOCC függő mechanizmust az inkább receptor aktivációs mechanizmustól. A drotaverin hasonlóan a nifedipinhez, koncentráció és mediátorfüggő módon gátolta mind a három konstriktor ágens hatását (**20. A ábra**). A drotaverin hatáserőssége a KCl-depolarizáció kiváltotta kontrakción egy nagyságrenddel nagyobbak bizonyult, mint a hisztaminnal, vagy a metakolinnal kiváltott kontrakción.

A teofillinnel nem sikerült releváns, koncentrációfüggő gátló hatást elérni, tekintettel, hogy amíg alacsony koncentráció tartományban nem gátolt, viszont 10^{-4} M követően simaizom kontrakciót váltott ki.



20. ábra: 3×10^{-6} M hisztaminnal, 5×10^{-7} M metakolinnal vagy 20 mM KCl-al kiváltott légúti simaizom kontrakció kialakulásának gátlása: (A) drotaverinnel, (B) nifedipinnel, (n=4). A teofillin alacsony hatáserevé miatt koncentráció-hatás görbéje nem volt meghatározható.

7. Megbeszélés

A légúti megbetegedések egy részében a tüdőfunkció csökkenésért a légúti simaizom fokozott konstriktor válasza tehető felelőssé. Ilyen fokozott konstriktor válasz jellemző az asztma bronchiale és a COPD bizonyos altípusaira. A légúti simaizom fiziológias működéséből következik, hogy minden olyan molekula, mely megemeli a légúti simaizom cAMP szintjét, csökkenti a Ca^{2+} -függő kontrakciós mechanizmusokat, így képes a simaizmot ernyeszteni, ezáltal visszaállítani a normál tüdő funkciót. Terápiás megközelítésként a cAMP szint emelkedését el lehet érni a cAMP szint fokozásával, másrésztől a keletkezett cAMP bomlásának a gátlásával. Mindkét mechanizmus hatással van a simaizom Ca^{2+} áramaira és a Ca^{2+} raktárak telítettségére, így a simaizom működésére is. Tehát mind a cAMP-szint emelés, mind a L-VOCC bakkoló hatás a légúti simaizom ernyesztésének irányába mutat. Így, minden olyan molekuláról, mely hatásmechanizmusa következtében megemeli a cAMP-szintet és gátolja a Ca^{2+} sejtbe áramlását, antiasztmatikus/anti-COPD hatás feltételezhető.

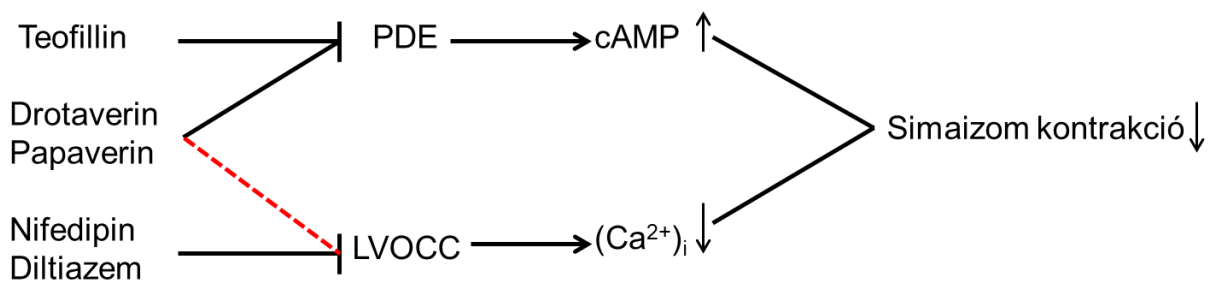
A görcsoldó drotaverint hatástanilag a PDE IV gátlók közé sorolják. Annak ellenére, hogy gyulladásoos sejtek fő cAMP metabolizáló enzime a PDE IV, mely gátlásával a gyulladásoos mediátorok felszabadulása gátolható, mely indokolná a drotaverin terápiás hatékonyságának vizsgálatát légúti obstruktív betegségekben, ilyen jellegű vizsgálatok eredményeinek nyomát a szakirodalomban nem találtam. Másrésztől, a drotaverin feltételezett L-VOCC bakkoló hatását nem bizonyították még funkcionális vizsgálatokkal. Bár az L-VOCC bakkoló nem mutattak átütő klinikai hatékonyságot az elzáródásoos légúti megbetegedésekben, szakirodalmi adatokból mégis arra lehet következtetni, hogy egy kevert PDE IV gátló/L-VOCC bakkoló molekula hatékony lehet az elzáródásoos légúti megbetegedések kezelésében. Ehhez viszont bizonyítanom kellett, hogy a drotaverin PDE IV gátló hatása mellett funkcionális L-VOCC bakkoló hatással is rendelkezik légúti simaizom preparátumon.

A drotaverinnel végzett funkcionális vizsgálatokhoz tengerimalac trachea preparátumokat használtunk. A tengerimalac légutainak anatómiája és fiziológiája nagy hasonlóságot mutat az emberével. Ezért az asztma és COPD preklinikai vizsgálataihoz ez az egyik leggyakrabban használt állatmodell, a kisméretű állatfajok közül. Mivel mind a cAMP-szint növekedése, mind a L-VOCC bakkolása funkcionálisan simaizom ernyesztést okoz, ezért ahhoz, hogy a PDE gátló hatás mellett az L-VOCC bakkoló hatást tanulmányozni tudjuk, speciális kísérleti körülményeket kellett teremtenünk.

7.1. Drotaverin hatása a depolarizáció kiváltotta légúti simaizom kontrakcióra

Első lépésében a KCl depolarizáció kiváltotta simaizom kontrakción tanulmányoztuk a drotaverin hatását. Annak érdekében, hogy a drotaverin L-VOCC-ra gyakorolt mindezidáig ki nem mutatott funkcionális gátló hatását megbízhatóan vizsgálni tudjuk a következő szempontokat vettük figyelembe:

1. L-VOCC működéssel egyértelműen összefüggő modellt kellett választanunk, valamint
2. olyan referencia anyagokat, amelyeknek L-VOCC és/vagy PDE szelektív gátló hatása bizonyított (**21. ábra**).



21. ábra: A kísérleteink során felhasznált simaizom relaxáló anyagok és molekuláris hatásmechanizmusai. A ciklikus nukleotidok lebontásának gátlása PDE inhibitorok alkalmazásával és/vagy, L-VOCC keresztüli Ca^{2+} influx gátlása révén a relaxáció irányába mutató folyamatokat eredményezett. A drotaverin feltételezett L-VOCC gátló hatását piros szaggatott vonallal jelöltem.

A KCl koncentrációját három lépésben kumulatív módon növelve váltottunk ki kontrakciót (5.4.2). Az L-VOCC blokkoló nifedipinnel és diltiazemmel történő előkezelés hatására a KCl kiváltotta simaizom kontrakciók maximum értékei csökkenést mutattak (**12. ábra**). Ez az eredmény várható volt, mivel *in vitro* a Ca^{2+} -csatorna blokkolók képesek szelektíven gátolni a membrán depolarizációt követő Ca^{2+} beáramlást és ennek nyomán a simaizom kontrakciót.

A teofillin PDE enzimek nem szelektív gátlása révén cAMP koncentráció növekedést okoz, amely PKA-n keresztül a K_{Ca} csatornák foszforilálásán és a SERCA Ca^{2+} felvételének fokozásán keresztül direkt módon csökkenti képes a $(\text{Ca}^{2+})_{\text{i}}$ -ot (**6. ábra**). Eredményeink azt mutatták, hogy a teofillin koncentrációjának a növelésével hiába emelkedik az intracelluláris cAMP koncentráció, nincs jelentős hatással a KCl depolarizáció kiváltotta simaizom kontrakcióra (**12. ábra**), amely bizonyítottan L-VOCC-n keresztüli Ca^{2+} influx vált ki (Hill-

Eubanks és mtsai, 2011). Tehát a hipotézisünk szerint, ha a drotaverinnek, a papaverinhez hasonlóan PDE gátlás mellett van L-VOCC gátló hatása is, akkor mindkét izokinolin vegyületnek gátolnia kell a KCl kiváltotta simaizom kontrakciót. Ennél fogva a papaverin és drotaverin koncentráció-függő hatása (**12. ábra**) a KCl kiváltotta simaizom kontrakción inkább magyarázható az L-VOCC-n keresztüli Ca^{2+} influx gátlásával, mintsem a cAMP-PKA útvonalakon keresztüli $(Ca^{2+})_i$ csökkenéssel. Ezen feltevésünket erősítették meg a teofillin-nifedipin keverék esetében kapott eredmények is (**12. ábra**), amelyek szerint a PDE gátló kiegészítve L-VOCC blokkoló hatással, felülmúlja a L-VOCC gátlók hatását (**2. táblázat**).

Összességében megállapítottuk a drotaverin depolarizáció kiváltotta kontrakció gátló hatását, valamint azt, hogy ha a PDE gátlót (teofillin) együtt alkalmazunk egy L-VOCC blokkolóval (nifedipin), akkor hatékonyabb légúti simaizom ernyesztést érhető el, mint külön-külön az egyes vegyületekkel (**2. táblázat**). A hipotézisünk szerint az előbbieken leírt jelenség mögött az intracelluláris Ca^{2+} influx akadályozása rejlik, amely PDE gátlással fokozható.

7.2. Drotaverin hatásának vizsgálata intracelluláris Ca^{2+} raktárak újratöltődésére

A következő kísérlet sorozatot úgy terveztük meg, hogy a légúti simaizom preparátumok Ca^{2+} raktárainak kiürítésével olyan kísérleti körülményeket teremtettünk, mely extracelluláris Ca^{2+} visszaadás után alkalmas a Ca^{2+} influx funkcionális következményeinek tanulmányozására. Az irodalmi adatok az mutatják, hogy a kiürített intracelluláris Ca^{2+} raktárak újratelődése az extracelluláris téréből a L-VOCC-n keresztül valósul meg (Bourreau és mtsai, 1991; Jenssen és Sims, 1993; Wu és mtsai, 2002). Ebből következik, hogy egy olyan modell, mely ezen Ca^{2+} újratöltődésre épül, alkalmas lehet a L-VOCC blokkoló hatás vizsgálatára. A PDE gátló vegyületek nem gátolják a Ca^{2+} újratöltődést. Így tehát egy jól megválasztott kísérleti protokoll felhasználhatónak látszik L-VOCC blokkoló hatás, PDE gátló hatás melletti szelektív kimutatására. A kísérleti modellben kihasználtuk azt a jelenséget, hogy az allergiás asztmában fontos patológiás szerepet játszó hisztamin és acetilkolin az intracelluláris Ca^{2+} szint függvényében vált ki különböző erősségű kontrakciót. Az acetilkolin (M3 agonista) illetve a hisztamin (H1 agonista) receptoraik aktivációján keresztül, képesek az SR-ből Ca^{2+} felszabadulás kiváltotta kontrakciót előidézni. Ezen aktiváció utáni kontrakcióban az L-VOCC-n keresztüli Ca^{2+} influxnak csak korlátozott szerepe lehet. Ezt támasztja alá az is, hogy az L-VOCC blokkolók gyakorlatilag hatástalanok az agonista által kiváltott légcső kontrakcióra (Drazen és mtsai, 1983; Advenier és mtsai,

1984; Ahmed és mtsai, 1985; Baersch és Frölich, 1995). Viszont az agonista kiváltotta kontrakciót ismételve L-VOCC blokkolók jelenlétében csökkent kontrakció maximumot figyeltek meg (Flores-Soto és mtsai, 2013). Összeségében megállapítható, hogy a légúti simaizom Ca^{2+} -mentes közegben is képes a kontrakcióra, amihez nincs szükség az L-VOCC-n keresztüli Ca^{2+} influxra. Ennek valószínűleg az az oka, hogy a ROC és más Ca^{2+} csatornák is részt vesznek a Ca^{2+} influxban (McFadzean és Gibson, 2002). Viszont Ca^{2+} mentes közegben az ismételt agonsita adagolás kiváltott kontrakció mértéke fokozatosan csökken, végül megszűnik (Creese és Denborough, 1981; Noguera és mtsai, 1994). Ahhoz, hogy az agonisták újra kontrakciót tudjanak kiváltani, az intracelluláris raktárakat újra kell tölteni Ca^{2+} -al. Gyakorlatban ezt úgy valósítottuk meg, hogy a Ca^{2+} -mentes közegben kiürített Ca^{2+} raktáru preparátumokat Ca^{2+} tartalmú oldatba történő visszahelyezéssel a Ca^{2+} raktárakat újratöltöttük. Annak valószínűségét, hogy az L-VOCC keresztüli Ca^{2+} influx jelenti a fő útvonalat a kontrakciót követő újratöltődésre Bourreau vetette fel először (Bourreau és mtsai, 1991; Bourreau és mtsai, 1993) kutya légcsövön vizsgálva a jelenséget, majd számos szerző is igazolta megállapítását (Dessy és Godfraind, 1996; Hirota és Janssen, 2007; Flores-Soto és mtsai, 2013). Ezt a jelenséget nyugalmi újratöltődésnek (resting refill) nevezték el, mivel az újratöltődés alatt a fiziológiás oldatban nincs agonista. A kísérletek során ezt a leírt jelenséget a mi méréseink is alátámasztották (**3. táblázat**) és az eredményeink azt mutatták, hogy a Ca^{2+} mentes Krebs-Henseleit oldatban az ismételt hisztamin, metakolin hatására a kontrakció fokozatosan csökkent. Az újratöltődést követően Ca^{2+} -mentes oldatban az agonisták ismét képesek voltak maximumhoz közeli kontrakciót kiváltani. Ezek az adatok azt a hipotézisünket támasztották alá, hogy az intracelluláris raktáron keresztüli Ca^{2+} felszabadulás kiváltotta kontrakció mediátor független, mivel kísérleteinkben mind a hízósejtek granulumaiból felszabaduló hisztamin, mind az M3 receptor agonista metakolin ugyanazt a hatást váltotta ki. Az irodalmi adatok szerint a nyugalmi Ca^{2+} újratöltődés a L-VOCC-on keresztül valósul meg. Saját kísérleti adataink is azt bizonyították, hogy a L-VOCC blokkoló nifedipin gátolta, míg a PDE gátló teofilin nem befolyásolta a nyugalmi Ca^{2+} újratöltődését (**13. és 14. ábra**) A drotaverin és a papaverin nagyon hasonlóan viselkedett az L-VOCC blokkolókhöz, mindkét vegyület nagymértékben gátolta a nyugalmi Ca^{2+} felvételt, ezáltal csökkentve a kontrakció maximumát. A PDE gátló teofilin, a két izokinolin származékkal szemben inkább segítette, mint gátolta a kontrakciót a **13. E** és **14. E ábra** adatai szerint.

Összefoglalva a tapasztalatainkat, kísérleti adatok arra engednek következtetni, hogy a nyugalmi újratöltődés folyamatában az L-VOCC döntő szerepet játszik a cAMP/PDE

rendszerhez képest. Az általunk kidolgozott kísérleti körülmények között kimutattuk, hogy a drotaverin rendelkezik L-VOCC-n keresztüli nyugalmi Ca^{2+} újratöltődést gátló hatással, amelyet mindez idáig nem mutattak ki funkcionális modellen.

7.3. CaCl_2 -kiváltotta kontrakció vizsgálata agonistát tartalmazó Ca^{2+} mentes oldatban

Ebben a kísérleti sorozatban azt vizsgáltuk, hogy a kiürített intracelluláris Ca^{2+} raktárak mellett, az extracelluláris Ca^{2+} pótlás utáni Ca^{2+} beáramlás milyen kinetikával zajlik konstriktor agonista jelenlétében. Alap feltevésünk az volt, hogy az extracellulárisan adott Ca^{2+} az L-VOCC-n keresztül Ca^{2+} influxot eredményez. Irodalmi adatok alapján a konstriktor GPCR agonisták intracelluláris Ca^{2+} emelkedést okoznak (Kume és mtsai, 2003), aktiválódnak a CLC csatornák (Liu és Farley, 1996), amelyek depolarizálják a légúti simaizomsejt membránját, aktiválják a L-VOCC-csatornákat, így további Ca^{2+} influxhoz vezetnek. Tehát a konstriktor agonista receptor aktiváció képes sejtmembrán depolarizációt okozni, ezáltal aktiválni az L-VOCC-n keresztüli Ca^{2+} influxot (Cuthbert és mtsai, 1994; Flores-Soto és mtsai, 2013). Az általunk kidolgozott kísérleti protokollban ezt a jelenséget használtuk ki a drotaverin potenciális funkcionális L-VOCC blokkoló hatásának további bizonyítására.

Ca^{2+} -mentes közegben történő Ca^{2+} raktár kiürítését követően hisztamin, vagy metakolin tartalmú Krebs-Henseleit oldatban sikerült CaCl_2 hozzáadásával olyan mértékű kontrakciót kiváltani, mint normál Ca^{2+} tartalmú Krebs-Henseleit oldatban hisztamin, vagy metakolin ugyanazon dózisének hozzáadásával. (**5. táblázat**). Nem tapasztaltunk eltérést a kontrakció időbeli kialakulásában sem attól függően, hogy normál Ca^{2+} szint jelenlétében konstriktor agonistát adtam, vagy kiürített Ca^{2+} raktár mellett agonista jelenlétében CaCl_2 -ot adtam a preparátumokhoz. Ez arra engedett következtetni, hogy a Ca^{2+} ROC-n és L-VOCC-n keresztül ugyanolyan hatékonyan penetrált a sejtekbe hisztamin és metakolin jelenlétében is. A L-VOCC szerepét a receptor aktiválta folyamatban bizonyítottuk megfigyelve, hogy az L-VOCC blokkoló nifedipin és diltiazem a Ca^{2+} beáramlás gátlásán keresztül csökkentette a CaCl_2 kiváltotta simaizom kontrakció kialakulásának a sebességét. A drotaverin és a papaverin is hatékonyan csökkentette a kontrakció időbeli kialakulásának sebességét (**6. táblázat**), ellenben a kontrakció maximumára alig voltak hatással (**17. ábra**). A drotaverin és a papaverin ezen hatása hasonlatos volt az L-VOCC blokkoló vegyületekéhez. A PDE gátló teofillin nem csökkentette sem a kontrakció kialakulásának sebességét, sem pedig annak maximumát. Így feltételezhető, hogy az alkalmazott kísérleti protokollal a drotaverin és a

papaverin funkcionális L-VOCC blokkoló hatását mutattuk ki és ebben a két izokinolin PDE gátló hatása nem játszik szerepet. Viszont a teofillin+nifedipin keverékkel kapott eredményeink azt mutatják, hogy a két molekula keveréke igen hatékonyan gátolta a vizsgált paramétereket (**6. táblázat**).

Ezen eredmények összegzése kapcsán elmondható, hogy a drotaverin hatása a receptor aktivációhoz köthető Ca^{2+} újratöltődés során jelentősen eltér a PDE gátló teofillinétől, ami nagy hasonlóságot mutat az L-VOCC gátlókéhoz. Az adatok elemzése kapcsán még egy fontos következtetést sikerült levonnunk az L-VOCC csatorna Ca^{2+} újratöltődésben való szerepéről. Eszerint, bár a receptor aktiváció kapcsán több Ca^{2+} -csatorna típus is aktiválódik, mégis az L-VOCC-ák játszik a fő szerepet a kiürített Ca^{2+} raktárak újra töltődésében.

7.4. Összehúzott preparátum ernyesztésének vizsgálata

A légúti megbetegedések közös jellemzője a nehézlégzés, fulladás, amelynek leggyakoribb kiváltó okai közé tartozik a hörgőszűkület okozta légáram csökkenése. A légáram csökkenésének hátterében állhatnak proliferatív sejtszaporulatok, vagy akár túlérzékenységi reakciók és a gyulladással sejtekből felszabaduló mediátorok, amelyek a légúti simaizom fokozott kontrakciójához vezetnek. Mivel a légső összehúzódás aktivációjában kulcsszerepet játszik az ioncsatornákon beáramló Ca^{2+} ezért az L-VOCC blokkolókkal már számos *in vivo* és *in vitro* kísérletet végeztek légső elzáródásos modellen (Drazen és mtsai, 1983; Nair és mtsai, 1984; Fanta és mtsai, 1987; Patakas és mtsai, 1987). Ennek ellenére az L-VOCC blokkolókat klinikai vizsgálatok során nem találták elég hatékonyak a légúti szűkület okozta megbetegedések kezelésében (Twiss és mtsai, 2002). A hörgő szűkület egy másik lehetséges kezelési módját jelentik a PDE gátlók és a β_2 -adrenoreceptor agonisták (Penn és mtsai, 1998; Johnson 2001; Fan Chung, 2006), amelyek a cAMP-szint növekedésén keresztül képesek relaxálni a légúti simaizmot. A PDE gátlókról, köztük a teofillinről megállapították, hogy képes a légúti gyulladás mellett a légúti simaizomra közvetlenül hatni, ezáltal bronchodilatációt kiváltani (Barnes, 2010). Tehát a már kialakult hörgőszűkület oldásához szükséges az intracelluláris cAMP szint növelése és a Ca^{2+} szint csökkentése. Ennél fogva logikusnak tűnt, hogy a drotaverin feltételezett L-VOCC-PDE gátló együttes hatását három kontrakciós mediátor, a KCl, a hisztamin és a metakolin segítségével teszteljük tovább.

Méréseink igazolták, Godfraind eredményeit, amely szerint a nifedipin koncentrációfüggő módon képes relaxálni a KCl depolarizáció kiváltotta kontrakciót

(Godfraind, 1983), valamint Drazen vizsgálatait, amelyben hatékonyan ernyesztették a hisztamin összehúzott légsövet (Drazen és mtsai, 1983). A kísérletek során kimutattuk, hogy a drotaverin hasonlóan viselkedett a nifedipinhez, mivel dózisfüggő módon ernyesztette mind a három mediátor által kiváltott kontrakciót, de a KCl által összehúzott preparátumon hatásos erőssége nagyobbak bizonyult, a hisztaminnal, valamint metakolinnal előidézett kontrakcióhoz képest. A teofillinről leírták, hogy képes a légúti simaizom relaxációjára (Rabe és mtsai, 1995), de a maximális relaxáció eléréséhez relatív magas koncentráció szükséges. Kísérletek során kimutattuk, hogy a teofillin képes volt ernyeszteni a három mediátor kiváltotta kontrakciót és a kapott eredmények nem mutattak jelentős eltérést a Guillot által megállapított teofillin EC_{50} értékéhez képest. (Guillot és mtsai, 1984) (**7. táblázat**). Viszont az EC_{50} értékek jóval a terápiás dózis felett voltak mind a három konstriktor esetén. A **18. ábrán** bemutatott koncentráció-hatás görbék jól mutatják, hogy a teofillin nem volt képes a nifedipinhez hasonló mediátorfüggő relaxációra.

Összeségében elmondható, hogy a drotaverin képes volt mind a három agonista által összehúzott légúti simaizom kontraktúra ernyesztésére, viszont hasonlóan a nifedipinhez, a legnagyobb hatásos erőt a KCl által összehúzott preparátumon mutatta. Ez a megfigyelés tovább erősíti korábbi kísérleti eredményeinket, mely szerint a drotaverin rendelkezik funkcionális L-VOCC blokkoló hatással.

7.5. A kontrakció kialakulásának gátlása

A már kialakult hörgő szűkület oldásán kívül igen fontos a kialakulásának megakadályozása. Az asztma, valamint a COPD kezelése és prevenciója során az Egészségügyi Minisztérium szakmai irányelve rohamoldó, vagy megelőző szerként a kis adagolású hosszú hatású teofillin kombináló szerként történő alkalmazására is ajánlást tesz a gyors hatású β_2 -agonisták, szisztémás szteroidok és antikolinerg szerek mellett (Csikós és Gajdácsi, 2011^{a,b}). Ezért kézenfekvőnek tűnt a drotaverint olyan *in vitro* modellen is vizsgálni, mely annak légúti simaizom kontrakciót megakadályozó, preventív hatását teszteli. Az eddigi adatok birtokában feltételezhető volt, hogy a drotaverin és a referens vegyületek is konstriktor mediátor függően fogják a kontrakció kialakulását gátolni.

A nifedipinnel kapcsolatban leírták, hogy képes a hisztamin (Patel és Al-Shamma, 1982), valamint a magas K^+ és Ca^{2+} kiváltotta kontrakció gátlására. Más szerzők megfigyelték, hogy a nifedipin hatásereősége körülbelül két nagyságrenddel magasabb extracelluláris K^+ koncentráció okozta kontrakció ernyesztésében, mint a receptor agonista kontrakció esetében (Advenier és mtsai, 1984; Nielsen-Kudsk és mtsai, 1986).

A kísérletei eredményeink alapján mi is hasonló megállapítást tettünk. Az eredményeink nagy egyezést mutattak az irodalmi adatokkal, mivel a nifedipin koncentrációfüggő módon csökkentette mind a hisztamin, mind a metakolin kiváltotta kontrakciót, de a hatásereősége négy nagyságrenddel magasabb volt K^+ koncentráció segítségével előidézett Ca^{2+} influx kiváltott kontrakción keresztül. A drotaverin bár kevésbé bizonyult hatásosnak a KCl kiváltotta kontrakció megakadályozásában, mint a nifedipin, de karakterisztikusan hasonlóan viselkedett (**19. ábra**), mivel a metakolinra és hisztaminra vonatkozó EC_{50} értékek (**8. táblázat**) egymáshoz nagyon közelinek bizonyultak, míg a KCl kontrakción a hatásereősége egy nagyságrenddel volt nagyobb.

A nifedipinnel kapott eredmények megfeleltek a várakozásainknak, mivel képes volt dózis és mediátorfüggő preventív kontrakció gátló hatásra, ellenben a teofillin a vártnál gyengébb hatást mutatott. A teofillin magas, 100 μM koncentrációban ugyan képes volt a preparátum ernyesztésére, de a koncentráció további emelése tartósan fennmaradó kontrakciót okozott az összes preparátumon, ezért a koncentráció-hatás függés a továbbiakban nem volt vizsgálható. Mivel a teofillin által kiváltott kontrakció nem várt hatás volt, ezért a jelenségre az irodalomban kerestem választ.

A teofillin metilxantin szerkezetű gyógyszeranyag (**3.8.1**), ezért szerkezetileg rokon vegyületnek tekinthető a szintén metilxantin-származék koffeinnel, amelyről leírták, hogy képes az intracelluláris raktárakban tárolt Ca^{2+} felszabadítására (Kobayashi és mtsai, 1986). Egy másik lehetséges magyarázat szerint a teofillin Ca^{2+} influxot idéz elő, amely valószínűleg a K^+ csatornák aktiválásán keresztül hiperpolarizálja a membránt (Sharon, 1986). Ezt a hipotézist támasztja alá az is, hogy a verapamil képes blokkolni a koffein hatását, amely SR-ből Ca^{2+} -ot szabadít fel viszont a teofillinre nincs hatással (Aubier és mtsai, 1983).

Összegezve a kontrakció gátlása során kapott eredményeimet, sikerült kimutatni, hogy a vizsgálati modellen a drotaverin képes preventív hatást gyakorolni, hasonlóan a nifedipinhez, amely hatásmechanizmusának hátterében az L-VOCC gátló hatás áll, szemben az ismert PDE IV blokkoló hatásával.

8. Összegzés

Az asztma és az egyéb krónikus légúti megbetegedések patomechanizmusában kiemelt fontosságot tulajdonítanak a PDE gátló anyagoknak, amelyek alkalmazásával fokozható a cAMP koncentrációja. A cAMP gátolja a gyulladáshoz vezető mediátorok felszabadulását, valamint a protein kináz A (PKA) aktiválása révén olyan szignál útvonalak aktiválására képes, amely végül a légúti simaizom relaxációjához vezet. Másfelől a légúti simaizom tónusának szabályozásáért közvetlenül felelős az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció. A depolarizálódás hatására a feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák aktiválódnak és a csatornákon keresztüli Ca^{2+} beáramlás beindítja a Ca^{2+} jel kialakulását. A további Ca^{2+} indukált Ca^{2+} felszabadulás végül izom-összehúzódáshoz vezet. A feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák közül az L-VOCC játszanak fontos szerepet ebben a folyamatban.

Kísérletek során a drotaverin L-VOCC-re gyakorolt Ca^{2+} antagonist hatásának a vizsgálatát végeztük el tengerimalac légcső preparátumon. Célunk volt olyan kísérleti körülményeket teremteni, hogy a drotaverin légcső simaizomra kifejtett hatásán keresztül az L-VOCC-re gyakorolt gátló hatás szelektíven mérhetővé váljon. A megvalósítás nehézségét az adja, hogy mind a PDE gátló mind a L-VOCC blokkoló hatás a simaizom relaxáció irányába mutat. Ennek tesztelése érdekében a drotaverin hatását funkcionális modelleken olyan anyagokéval hasonlítottuk össze, amelyek irodalmi adatok alapján ismert PDE gátló és/vagy L-VOCC blokkoló hatással rendelkeznek.

Eredményeink azt mutatják, hogy a kiválasztott referencia anyagok az irodalmi adatoknak megfelelően a PDE enzim gátlásával, és/vagy az L-VOCC-n keresztüli Ca^{2+} influx blokkolásával képesek voltak simaizom relaxációt okozni, vagy dózis-függő módon meggátolni a kontrakció kialakulását. Ennek megfelelően a kiválasztott funkcionális modellek alkalmasnak bizonyultak a drotaverin L-VOCC blokkoló hatásának a vizsgálatára.

Kimutattuk, hogy a drotaverin hatékonyan csökkentette a depolarizáció kiváltotta simaizom relaxáció maximum értékeit, de hatással volt a Ca^{2+} depletált Ca^{2+} raktárak újratöltődésének mértékére is, mind nyugalmi, mind receptor aktivált újratöltődés során. Megfigyeltük azt is, hogy hatása nem korlátozódott a kontrakció maximumának csökkentésére, hanem hatással volt a Ca^{2+} újratöltődés kinetikájára is. A kísérleteink kiértékelése során még egy fontos megállapítást tettünk, amely szerint a Ca^{2+} depletált légúti preparátum Ca^{2+} -al való újratöltődésében az L-VOCC-nak kiemelt szerepe van.

Eredményeink kapcsán elmondható, hogy a drotaverint a PDE IV és L-VOCC gátló tulajdonsága alkalmassá teheti azon obstruktív légúti megbetegedések kezelésére, amelyek

patomechanizmusának háttérében a fokozott simaizom kontrakció mellett a gyulladásos mediátorok felszabadulása áll.

9. Summary

PDE inhibitors have particular importance in the pathomechanism of asthma and other chronic respiratory diseases, and can be used to increase the concentration of cAMP. The activation of protein kinase A by cAMP leads to relaxation of the respiratory smooth muscle across different signaling pathways. On the other hand, the intracellular Ca^{2+} concentration is directly responsible for regulating the airway smooth muscle tone. Depolarization causes Ca^{2+} influx through the voltage-dependent Ca^{2+} channels by Ca^{2+} signal and further Ca^{2+} induced Ca^{2+} release which eventually leads to muscular contraction. Among the voltage-dependent Ca^{2+} channels, L-VOCC plays an important role in this process.

During the experiments, the L-VOCC blocking effect of drotaverin was tested on guinea pig trachea preparations. The aim was to create such an experimental conditions where the L-VOCC inhibitory effect of drotaverine can be measured selectively on airway smooth muscle. The difficulty of the implementation was that both the PDE inhibitor and the L-VOCC blocking effect point to the smooth muscle relaxation. To distinguish these effects the drotaverin was compared to well-known PDE inhibitory and/or L-VOCC blocking substances on functional models.

It was demonstrated that selected references were able to induce smooth muscle relaxation and concentration-dependent suppression of contraction by blocking the PDE enzyme and / or blocking the Ca^{2+} influx through L-VOCC in accordance with the literature. Therefore, the selected functional models considered to be appropriate for testing the L-VOCC blocking effect of drotaverin.

The results highlighted that drotaverin was not only capable to reduce the maximum values of depolarization-induced smooth muscle relaxation, but also had an effect of the rechargement of Ca^{2+} depleted Ca^{2+} storages during in resting and receptor-activated circumstances. It was also demonstrated that its effect was not limited to reducing the maximum of the contraction, but had an impact on the kinetics of Ca^{2+} refill. There was another important observation made that L-VOCC played a key role in refilling of Ca^{2+} depleted airway smooth muscle with Ca^{2+} .

By all means, our results showed, that drotaverine that acts as PDE inhibitor and L-VOCC blocker in one compound, may have a relevant role in the treatment of obstructive airway diseases which cause the release of inflammatory mediators and increased smooth muscle contraction. Concerning our results, drotaverin probably enables to treat airway

diseases which caused by the release of inflammatory mediators and increased smooth muscle contraction due to its PDE IV and L-VOCC inhibitory properties.

10. Hivatkozások

Acierno LJ, Worrell LT. Albrecht Fleckenstein: father of calcium antagonism. *Clin Cardiol.* 2004; 27:710-1.

Adcock IM, Ito K, Barnes PJ Histone deacetylation: an important mechanism in inflammatory lung diseases. *COPD.* 2005, 2:445-55.

Adriaensen D, Brouns I, Pintelon I, De Proost I, Timmermans JP. Evidence for a role of neuroepithelial bodies as complex airway sensors: comparison with smooth muscle-associated airway receptors. *J Appl Physiol.* 2006, 101:960–70

Advenier C, Cerrina J, Duroux P, Floch A, Renier A. Effects of five different organic calcium antagonists on guinea-pig isolated trachea. *Br J Pharmacol* 1984;82: 727±733.

Ahmed F, Foster RW, and Small RC (1985) Some effects of nifedipine in guinea-pig isolated trachealis. *Br J Pharmacol*

Alexander SPH, Peters JA. 1999 Receptor & Ion Channel Nomenclature Supplement. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20:100-106.

Amdur MO, Mead J. Mechanics of respiration in unanesthetized guinea pigs. *Am J Physiol.* 1958;192:364–8.

Ashman DF, Lipton R., Melicow M.M., Price T.D. Isolation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate from rat urine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1963;11:330–334

Ay B, Iyanoye A, Sieck GC, Prakash YS, Pabelick CM (2006). Cyclic nucleotide regulation of store-operated Ca²⁺ influx in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: 278–283.

Aubier, M, D. Murciano, N. Viires, Y. Lecocguic, and R. Pariente. Diaphragmatic contractility enhanced by aminophylline: role of extracellular calcium. *J. Appl. Physiol.: Respirat. Environ. Exercise Physiol.* 1983; 54:460-464.

Bachelet M, Vincent D, Havet N, Marrash-Chahla R, Pradalier A, Dry J, Vargaftig BB. Reduced responsiveness of adenylate cyclase in alveolar macrophages from patients with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1991;88:322–328.

Baersch G and Frölich JC. Differential effects of two calcium channel blockers on bronchial smooth muscle. *Arzneimittelforschung* 1995; 45:1294–1297.

Barnes PJ. Calcium-channel blockers and asthma. *Thorax.* 1983;38: 481–485.

Barnes PJ. The third nervous system in the lung: physiology and clinical perspectives. *Thorax.* 1984;39: 561–567.

Barnes PJ. Clinical studies with calcium antagonists in asthma. *Br J Clin Pharmacol* 1985; 20:289-298.

Barnes PJ. New drugs for asthma. *Eur Respir J* 1992;5:1126-1136.

Barnes PJ. Against the Dutch Hypothesis: Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease are distinct diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Aug 1;174(3):240-3

- Barnes PJ.** Theophylline. *Pharmaceuticals*, 2010;3:725-747;
- Billington CK, Penn RB.** Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respir Res.* 2003;4:2.
- Billington CK, Ojo OO, Penn BR, Itod S,** cAMP Regulation of Airway Smooth Muscle *Pulm Pharmacol Ther.* 2013;26:112–120.
- Billington CK, Raymond BP, Ian PH.** β_2 Agonists. *Pharmacol Ther Asthma and COPD* 2017;23-40
- Brendan J. Canning and Yangling Chou.** Using guinea pigs in studies relevant to asthma and COPD. *Pulm Pharmacol Ther.* 2008; 21:702–720.
- Brocklehurst WE.** The release of histamine and formation of a slow-reacting substance (SRS-A) during anaphylactic shock. *J Physiol.* 1960;151:416–35.
- Bourreau JP, Abela AP, Kwan CY, Daniel EE.** Acetylcholine Ca^{2+} stores refilling directly involves a dihydropyridine-sensitive channel in dog trachea. *Am J Physiol* 1991;261:497-505.
- Bureau MF1, De Clerck F, Lefort J, Arreto CD, Vargaftig BB.** Thromboxane A2 accounts for bronchoconstriction but not for platelet sequestration and microvascular albumin exchanges induced by fMLP in the guinea pig lung. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992;260:832-40.
- Burgess GM, Godfrey PP, McKinney JS, Berridge MJ, Irvine RF, Putney JW., Jr** The second messenger linking receptor activation to internal Ca release in liver. *Nature.* 1984;309:63–6.
- Canning BJ.** Modeling asthma and COPD in animals: a pointless exercise? *Curr Opin Pharmacol.* 2003;3:244–50.
- Canning BJ.** Reflex regulation of airway smooth muscle tone. *J Appl Physiol.* 2006;101:971–85.
- Canning BJ, Mori N, Mazzone SB.** Vagal afferent nerves regulating the cough reflex. *Respir Physiol Neurobiol.* 2006;152:223–42.
- Cardell LO, Edvinsson L.** Characterization of the histamine receptors in the guinea-pig lung: evidence for relaxant histamine H3 receptors in the trachea. *Br J Pharmacol.* 1994;111:445-54.
- Cerrina J, Denjean A, Alexandre ,G., Lockhart A, Duroux,P.** Inhibition of exercise-induced asthma by a calcium antagonist, nifedipine. *Am Rev Resp Dis* 1981;123:156-160.
- Cerrina J, Advenier C, Renier A, Floch A, and Duroux P.** Effects of diltiazem and other Ca21 antagonists on guinea-pig tracheal muscle. *Eur J Pharmacol* 1983;94:241–249.
- Chabot-Fletcher MC, Underwood DC, Breton JJ, Adams JL, Kagey-Sobotka A, Griswold DE, et al.** Pharmacological characterization of SB 202235, a potent and selective 5-lipoxygenase inhibitor: Effects in models of allergic asthma. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995;273:1147–55.
- Charette L, Misquitta C, Guay J, Riendeau D, Jones TR.** Involvement of cyclooxygenase 2 (COX-2) in intrinsic tone of isolated guinea pig. *Canadian J Physiol and Pharmacol* 1995;73:1561-1567

Cheng JB and Townley RG. Pharmacological characterization of effects of nifedipine on isolated guinea-pig and rat tracheal smooth muscle. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1983;263:228–244.

Choi HK, Finkbeiner WE, Widdicombe JH. A comparative study of mammalian tracheal mucous glands. *J Anat* 2000;197:361–72.

Clyman RI, Manbaneillo VC, Lovell-Smith CJ, and Vauchan, M Ca uptake by subcellular fractions of human umbilical artery. *Am. J. Physiol.* 1976;231:1074-81.

Coburn RF Peripheral airway ganglia. *Annu Rev Physiol* 1987;49:573-582.

Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest.* 1989;84:1470–8.

Corompt E, Bessard G, Lantuejoul S, Naline E, Advenier C, Devillier P. Inhibitory effects of large Ca²⁺-activated K⁺ channel blockers on beta-adrenergic- and NO-donor-mediated relaxations of human and guinea-pig airway smooth muscles. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1998;357:77–86.

Corteling RL, Li S, Giddings J, Westwick J, Poll C, Hall IP. Expression of transient receptor potential C6 and related transient receptor potential family members in human airway smooth muscle and lung tissue. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;30:145–154.

Cortijo J, Bou J, Beleta J, et al. Investigation into the role of phosphodiesterase IV in bronchorelaxation, including studies with human bronchus. *Br J Pharmacol* 1993;108:562-568.

Creese BR and Denborough MA. Sources of calcium for contraction of guineapig isolated tracheal smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1981;8:175–182.

Charette L, Misquitta C, Guay J, Riendeau D, Jones TR. Involvement of Cyclooxygenase 2 (Cox-2) in Intrinsic Tone of Isolated Guinea-Pig Trachea. *Can J Physiol Pharmacol* 1995;73:

Cuthbert NJ, Gardiner PJ, Nash K, Poll CT. Roles of Ca²⁺ influx and intracellular Ca²⁺ release in agonist-induced contractions in guinea pig trachea. *Am J Physiol.* 1994;266:620-7.

Cutz E, Jackson A. Neuroepithelial bodies as airway oxygen sensors. *Respir Physiol.* 1999;115:201–14.

a, Csikós A, Gajdácsi J, A krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD) diagnosztikája és gyógyszeres kezelése Országos Egészségbiztosítási Pénztár Elemzési, Orvosszakértői és Szakmai Ellenőrzési Főosztály, 2011, Budapest.

b, Csikós A, Gajdácsi J, Az asthma bronchiale diagnosztikája és gyógyszeres kezelése felnőttkorban Országos Egészségbiztosítási Pénztár Elemzési, Orvosszakértői és Szakmai Ellenőrzési Főosztály, 2011, Budapest.

Dale HH. The anaphylactic reaction of plain muscle in the guinea pig. *J Pharmacol Exp Ther.* 1913;4:167–223.

Dalen H. An ultrastructural study of the tracheal epithelium of the guinea-pig with special reference to the ciliary structure. *J Anat.* 1983;136:47–67.

- Daniel** EE, Kannan M, Davis C, Posey-Daniel V. Ultrastructural studies on the neuromuscular control of human tracheal and bronchial muscle. *Respir Physiol.* 1986;63:109-28.
- De Boer** J, Philpott AJ, van Amsterdam RGM, Shahid M, Zaagsma J, Nicholson CD. Human bronchial cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes: biochemical and pharmacological analysis using selective inhibitors. *Br J Pharmacol* 1992;106: 1028±1034.
- Dessy** C and Godfraind T. The effect of L-type calcium channel modulators on the mobilization of intracellular calcium stores in guinea-pig intestinal smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 1996;119:142–148.
- Diamond** J and Homles, TG. Effect of potassium chloride and smooth muscle relaxants on tension and cyclic nucleotide levels in rat myometrium. *Can. J. Physiol. Pharmac.* 1975;53, 1099-1107.
- Dimaond** J and Marshall, J. M. Smooth muscle relaxants: Dissociation between resting membrane potential and resting tension in rat myometrium. *J. Pharmac. exp. Ther.* 1969;168, 13—20.
- Di Somma** S, de Divitiis M, Bertocchi F, Carotenuto A, Cudemo G, Petitto M, Napodano M, de Divitiis O. Treatment of hypertension associated with stable angina pectoris: favourable interaction between new metoprolol formulation (OROS) and nifedipine. *Cardiologia.* 1996;41:635-43.
- Drazen** JM, Fanta CH and Lacouture PG Effect of nifedipine on constriction of human tracheal strips in vitro. *Br J Pharmacol.* 1983;78:687–691
- Ellis** JL, Udem BJ. Role of cysteinyl-leukotrienes and histamine in mediating intrinsic tone in isolated human bronchi. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;149:118–22.
- Estenne** M, Yernault J, De Troyer, A. Effects of parenteral aminophylline on lung mechanics in normal humans. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1980;121:967–971.
- Fan** Chung K. Phosphodiesterase inhibitors in airways disease. *Eur J Pharmacol* 2006;533:110–117.
- Fanta** CH, Venugopalan, CS, Lacoutere PG, Drazen J.M. Inhibition of bronchoconstriction in the guinea pig by a calcium channel blocker, nifedipine. *Am Rev Resp Dis.* 1982;125,61-66.
- Fanta** CH, Watson JW, Lacouture PG, and Drazen JM: In vivo bronchodilator activity of nifedipine in the guinea pig. *Am Rev Respir Dis* 1987;136: 76–79.
- Finney** MJB, Karlson, J.A, Persson CGA. Effects of bronchoconstriction and bronchodilation on a novel human small airway preparation. *Br. J. Pharmacol.* 1985;85:29–36.
- FitzPatrick** M, Donovan C, Bourke JE. Prostaglandin E2 elicits greater bronchodilation than salbutamol in mouse intrapulmonary airways in lung slices. *Pulm Pharmacol Ther* 2014;28: 68-76.
- Fleischmann** BK, Murray RK, Kotlikoff MI. A voltage window for sustained elevation of cytosolic calcium in smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994;91:11914–11918.

Flores-Soto E, Reyes-García J, Sommer B, and Montaña LM. Sarcoplasmic reticulum Ca(21) refilling is determined by L-type Ca(21) and store operated Ca(21) channels in guinea pig airway smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 2013;721:21–28.

Foster RW, Small RC, Weston AH. The spasmogenic action of potassium chloride in guinea-pig trachealis. *Br J Pharmacol*. 1983;80:553-9.

Foster RW, Okpalugo BI, and Small RC. Antagonism of Ca21 and other actions of verapamil in guinea-pig isolated trachealis. *Br J Pharmacol* 1984;81:499–507.

Frandsen EK, Krishna GA, Said SI. Vasoactive intestinal polypeptide promotes cyclic adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in guinea-pig trachea. *Br J Pharmacol* 1978;62:367-369.

Georg M. "Vorläufige Notiz über eine neue organische Base im Opium" [Preliminary notice of a new organic base in opium]. *Annalen der Chemie und Pharmacie*. 1848;66:125–128.

Giovanni B, Michele B, Emanuele C, and Vito B Beta-Adrenergic Agonists Pharmaceuticals. 2010;3:1016–1044.

Giovannini F, Sher E, Webster R, Boot J, Lang B. Calcium channel subtypes contributing to acetylcholine release from normal, 4-aminopyridine-treated and myasthenic syndrome auto-antibodies-affected neuromuscular junctions. *Br J Pharmacol*. 2002;136:1135–1145.

Godfraind TJ. Actions of nifedipine on calcium fluxes and contraction in isolated rat arteries. *Pharmacol Exp Ther*. 1983;224:443-50.

Godfraind T, Miller R, Wibo M. Calcium antagonism and calcium entry blockade. *Pharmacol. Rev*. 1986;38:321–416.

Guillot C, Fornaris M, Badger M, Orehek J. Spontaneous and provoked resistance to isoproterenol in isolated human bronchi. *J. Allergy Clin. Immunol*. 1984;74:713–718.

Hart MJ, Jiang X, Kozasa T, Roscoe W, Singer WD, Gilman AG, Sternweis PC, Bollag G. Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Gα13. *Science*, 1998; 280:2112-4

Hartley D, Jack D, Lunts LH, Ritchie AC. New class of selective stimulants of beta-adrenergic receptors. *Nature*. 1968;219:861–2.

Hartmann V, Magnussen H. Effect of diltiazem on histamine- and carbachol-induced bronchospasm in normal and asthmatic subjects. *Chest*. 1985;87:174-9.

Hendeles L, Hill M, Harman E, Moore P, Pieper J. Dose-response of inhaled diltiazem on airway reactivity to methacholine and exercise in subjects with mild asthma. *Clin Pharmacol Ther*. 1988;43:387-92.

Higby K, Suiter CR. A risk–benefit assessment of therapies for preterm labor. *Drug Saf*. 1999;21:35– 56.

Hill, SJ. Distribution, properties, and functional characteristics of three classes of histamine receptor. *Pharmacol Rev*. 1990;42:45-83.

Hill-Eubanks DC, Werner ME, Heppner TJ, Nelson MT. Calcium signaling in smooth muscle. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011; 2011;3:a004549.

- Hiramatsu M**, Takiguchi O, Nishiyama A, Mori H. Cilostazol prevents amyloid β peptide (25-35)-induced memory impairment and oxidative stress in mice. *Br J Pharmacol*. 2010;161:1899-912
- Hirota K**, Hashiba E, Yoshioka H, Kabara S, Matsuki A. Effects of three different L-type Ca^{2+} entry blockers on airway constriction induced by muscarinic receptor stimulation. *Br J Anaesth*. 2003;90:671-5.
- Hirota S** and Janssen LJ. Store-refilling involves both L-type calcium channels and reverse-mode sodium-calcium exchange in airway smooth muscle. *Eur Respir J* 2007;30:269–278.
- Honda K**, Tomita T. Electrical activity in isolated human tracheal muscle. *Jpn J Physiol* 1987;37:333-336
- Huber HL**, Koessler KK. The pathology of bronchial asthma. *Arch Intern Med* 1922;30:689–760.
- Huddart H**, Saad KH. Papaverine-induced inhibition of electrical and mechanical activity and calcium movements of rat ileal smooth muscle. *J Exp Biol*. 1980;86:99-114.
- Hughes T**. Microcirculation of the tracheobronchial tree. *Nature*. 1965;206:425–6.
- Hunninghake GW**, Gallin JI, Fauci AS. Immunologic reactivity of the lung: the in vivo and in vitro generation of a neutrophil chemotactic factor by alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis*. 1978;117:15–23.
- Ichinose M** and Barnes P.J. Inhibitory histamine H_3 -receptors on cholinergic nerves in human airways. *Eur J Pharmacol*. 1989;163:383-386.
- Iguchi M**, Nakajima T, Hisada T, Sugimoto T, Kurachi Y On the mechanism of papaverine inhibition of the voltage-dependent Ca^{++} current in isolated smooth muscle cells from the guinea pig trachea. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992;263:194-200.
- Imaizumi, Y.**, Takeda, M., Muraki, K., Watanabe, M.: Mechanisms of NE-induced reduction of Ca current in single smooth muscle cells from guinea pig vas deferens. *Am. J. Physiol*. 1991;260:C17–C25.
- Impens N**, Reiss TF, Teahan JA, Desmet M, Rossing TH, Shingo S, et al. Acute bronchodilation with an intravenously administered leukotriene D4 antagonist, MK-679. *Am Rev Respir Dis*. 1993;147:1442–6.
- Inoue, Y**, Sperlakis, N. Gestational change in Na + and Ca^{2+} channel current densities in rat myometrial smooth muscle cells. *Am. J. Physiol*. 1991;260:C658– C663.
- Ito K**, Lim S, Caramori G, Cosio B, Chung KF, Adcock IM, Barnes PJ. A molecular mechanism of action of theophylline: Induction of histone deacetylase activity to decrease inflammatory gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:8921-6
- Ito Y**, Suzuki H, Aizawa H, Hakoda H, Hirose T. The spontaneous electrical and mechanical activity of human bronchial smooth muscle: its modulation by drugs. *Br J Pharmacol* 1989; 98: 1249-1260

Ito S, Kume H, Yamaki K, Katoh H, Honjo H, Kodama I, Hayashi H. Regulation of capacitance and noncapacitance receptor-operated Ca²⁺ entry by rho-kinase in tracheal smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;26:491-8.

Janssen LJ, Sims SM. Emptying and refilling of Ca²⁺ store in tracheal myocytes as indicated by ACh-evoked currents and contraction. *Am J Physiol*. 1993;265:C877-86.

Jartti T. Asthma, asthma medication and autonomic nervous system dysfunction. *Clin Physiol* 2001;21:260-269.

Jose PJ, Griffiths-Johnson DA, Collins PD, Walsh DT, Moqbel R, Totty NF, et al. Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J Exp Med*. 1994;179:881-7.

Johnson M. Beta2-adrenoceptors: mechanisms of action of beta2-agonists. *Paediatr Respir Rev* 2001;2:57-62.

Kagayama K, Morimoto T, Nagata S, et al. Synthesis and biological evaluation of novel phthalazinone derivatives as topically active phosphodiesterase 4 inhibitors. *Bioorg Med Chem*. 2009;17:6959-70.

Kannan MS, Prakash YS, Johnson DE, Sieck GC. Nitric oxide inhibits calcium release from sarcoplasmic reticulum of porcine tracheal smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1997;272:L1-L7.

Karaki H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-Saito M, Amano K, Harada K, Miyamoto S, Nakazawa H, Won KJ, Sato K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev*. 1997;49:157-230.

Karaki H, Urakawa N, Kutsky P. Potassium-induced contraction in smooth muscle. *Nihon Heikatsukin Gakkai Zasshi*. 1984;20:427-44.

Kazda S. The Story of Nifedipine. 1991;Adalat 9-26

Kauppi P, Kupiainen H, Lindqvist A, et al. Overlap syndrome of asthma and COPD predicts low quality of life. *J Asthma* 2011;48:279-85

Kimoto Y, Kessler R, Constantinou CE. Relaxation mechanisms of antispasmodics papaverine and thiphenamil on the human corpus cavernosum. *J Urol*. 1990;144:1497-9

Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 1996;273:245-8.

Kobayashi S, Kanaide H, Nakamura M. Complete overlap of caffeine- and K⁺ depolarization-sensitive intracellular calcium storage site in cultured rat arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1986;261:15709-13.

Koga Y, Sodeyama N, Satoh S, Teshigawara T, Yanagisawa T, Taira N, Endoh M. Relaxation of airway smooth muscle induced by potassium in the presence of Ca-antagonists. *Jpn J Pharmacol*. 1989;50:387-96.

Kojima M, Dohi Y, Sato K. Ryanodine-induced contraction in femoral artery from spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*. 1994;254:159-165.

- Korbonits D.** 4.fejezet: A Chinoin fontosabb innovációs eredményei. Egy mindig megújuló vállalat: A Chinoin története, 1996;91-105
- Kotlikoff MI.** Potassium channels in airway smooth muscle: a tale of two channels. *Pharmacol Ther.* 1993;58:1-12.
- Knox AJ, Tattersfield AE.** Airway smooth muscle relaxation. *Thorax* 1995;50:894-901.
- Kremer, S. G., Breuer, W. V., Skorecki K. L.:** Vasoconstrictor hormones depolarize renal glomerular mesangial cells by activating chloride channels. *J. Cell Physiol.* 1989;138:97–105.
- Kroneberg HG:** In memoriam Albrecht Fleckenstein. *Cardiovasc Drug Rev* 1992;10,1:1–2
- Kukovetz WR and Pösch G.** Inhibition of cyclic-3',5'-nucleotide-phosphodiesterase as a possible mode of action of papaverine and similarly acting drugs. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1970;267:189–194.
- Kume H, Ishikawa T, Oguma T, Ito S, Shimokata K, Kotlikoff MI.** Involvement of Ca²⁺ mobilization in tachyphylaxis to β -adrenergic receptors in trachealis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29:359-66.
- Kume H, Mikawa K, Takagi K, Kotlikoff MI.** Role of G proteins and K⁺ channels in the muscarinic and beta- adrenergic regulation of airway smooth muscle. *Am J Physiol* 1995; 268:221-229.
- Kume H, Takai A, Tokuno H, Tomita T.** Regulation of Ca²⁺-dependent K⁺-channel activity in tracheal myocytes by phosphorylation. *Nature* 1989;341:152-4.
- Kume H, Hall IP, Washabau RJ, Takagi K, Kotlikoff MI.** β -adrenergic agonists regulate K⁺ channels in airway smooth muscle by cAMP-dependent and -independent mechanisms. *J Clin Invest* 1994;93:371-9.
- Kume H, Ca²⁺ Dynamics and Ca²⁺ Sensitization in the Regulation of Airway Smooth Muscle Tone, Muscle Cell and Tissue,** 2015;11:289-329
- Lefkimiatis K, Srikanthan M, Maiellaro I, Moyer MP, Curci S, Hofer AM.** Store-operated cyclic AMP signalling mediated by STIM1. *Nat Cell Biol* 2009;11:433–442.
- Liu X, Farley JM.** Acetylcholine-induced chloride current oscillations in swine tracheal smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996;276:178–186
- Low RI, Takeda P, Lee G, Mason DT, Awan NA, Demaria AN:** Effects of diltiazem-induced calcium blockade upon exercise capacity in effort angina due to chronic coronary artery disease. *Am Heart J.* 1981;101:713.
- Maggi CA, Giachetti A, Dey RD, Said SI.** Neuropeptides as regulators of airway function: vasoactive intestinal peptide and the tachykinins. *Physiol Rev* 1995;75:277-322.
- Magnussen H, Hartmann V, Reuss G.** Influence of diltiazem on bronchoconstriction induced by cold air breathing during exercise. *Thorax.* 1984;39:579-82.
- Male PE, Wasserman an MA, Griffin RL.** Effect of intravenous and aerosol nifedipine on prostaglandin F₂ and histamine induced bronchoconstriction in anaesthetised dog. *J Pharmacol Expr Ther.* 1982;221:410-15

- Mariam** Ba, Cherie AS, Manoj T, Colleen B, Josh EB, Christine C, Andrew H, William TG. HSP20 phosphorylation and airway smooth muscle relaxation Cell Health Cytoskelet. 2009;1:27–42.
- Martin** AC, Willoughby D, Ciruela A, Ayling LJ, Pagano M, Wachten S, Tengholm A, Cooper DM. Capacitative Ca²⁺ entry via Orai1 and stromal interacting molecule 1 (STIM1) regulates adenylyl cyclase type 8. Mol Pharmacol. 2009;75:830-42.
- McFadzean** I and Gibson A. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. Br J Pharmacol. 2002;135:1–13.
- Meurs** H, Santing RE, Remie R, van der Mark TW, Westerhof FJ, Zuidhof AB, et al. A guinea pig model of acute and chronic asthma using permanently instrumented and unrestrained animals. Nat Protoc. 2006;1:840–7.
- Mészáros** Z, Szentmiklósi P, Czibula I. 1961: Hungarian Patent. No. 150, 535.
- Milgrom** H, Bender B. Current issues in the use of theophylline. Am Rev Respir Dis. 1993; 147:33–S39.
- Miodonski** A, Kus J, Tyrankiewicz R. Scanning electron micro-scopical study of tracheal vascularization in guinea pig. Arch Otolaryngol. 1980;106:31–7
- Miyamoto** K, Kurita M, Sakai R, Sanae F, Wakusawa S, Takagi K. Cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes in guinea-pig tracheal muscle and bronchorelaxation by alkylxanthines. Biochem Pharmacol. 1994;48:1219-1223.
- Morice** A, Unwin RJ, Sever PS. Vasoactive intestinal peptide causes bronchodilatation and protects against histamine-induced bronchoconstriction in asthmatic subjects. Lancet 1983;2: 1225-1227.
- Morrison** KJ, Vanhoutte PM. Stimulation of sodium pump by vasoactive intestinal peptide in guinea-pig isolated trachea: potential contribution to mechanisms underlying relaxation of smooth muscle. Br J Pharmacol 1996;118:557-562.
- Muccitelli** RM, Tucker SS, Hay DW, Torphy TJ, Wasserman MA. Is the guinea pig trachea a good in vitro model of human large and central airways? Comparison on leukotriene-, methacholine-, histamine- and antigen-induced contractions. J Pharmacol Exp Ther. 243:467-73.
- Muraki**, K., Bolton, T. B., Imaizumi, Y., Watanabe, M.: Effect of isoprenaline on Ca²⁺ channel current in single smooth muscle cells isolated from taenia of the guinea-pig caecum. J Physiol. 1993;471:563–582.
- Murray** MA, Berry JL, Cook SJ, Foster RW, Green KA, Small RC. Guinea-pig isolated trachealis: the effects of charybdotoxin on mechanical activity, membrane potential changes and the activity of plasmalemmal K⁺-channels. Br J Pharmacol 1991;103:1814-1818.
- Murray** RK, Kotlikoff MI. Receptor-activated calcium influx in human airway smooth muscle cells. J Physiol. 1991; 435:123-144.
- Nair** N, Townley RG, Bewtra A, Nair CK: Safety of nifedipine in subjects with bronchial asthma and COPD Chest. 1984; 86:515–518.

Nazinigouba O, Etienne R Physiology of Airway Smooth Muscle Contraction: An Overview. *J Pulm Resp Med.* 2014;4-6

Ndukwu IM, White SR, Leff AR, Mitchell RW. EP1 receptor blockade attenuates both spontaneous tone and PGE2-elicited contraction in guinea pig trachealis. *Am J Physiol.* 1997;273:626–33.

Nelson MT, Standen NB, Brayden JE, Worley JF. Noradrenaline contracts arteries by activating voltage-dependent calcium channels. *Nature* 1988;336:382–385.

Nielsen-Kudsk JE, Karlsson JA, Persson CG. Relaxant effects of xanthines, a β_2 -receptor agonist and Ca^{2+} antagonists in guinea-pig tracheal preparations contracted by potassium or carbachol. *Eur J Pharma-col* 1986;128:33-40.

Noguera MA, Chuliá S, Ivorra MD, and D'Ocon MP. Effect of different treatments in calcium-free medium on basal tone and contractile responses of guinea pig tracheae. *Pharmacology* 1995;50:313–323.

O'Byrne PM, Kerstjens HAM. Inhaled beta-2-agonists in the treatment of asthma. *N Engl J Med.* 1996;335:886-888.

Ohashi M and Takayanagi I. The actions of D 600, aspaminol and papaverine on calcium-, potassium- and histamine-induced contractions of isolated rabbit basilar artery, aorta, taenia coli and tracheal smooth muscle. *Jpn J Pharmacol.* 1983;33:1135–1144.

Orehek J, Douglas JS, Bouhuys A. Contractile responses of the guinea-pig trachea in vitro: modification by prostaglandin synthesisinhibiting drugs. *J Pharmacol Exp Ther.* 1975;194:554–64.

Pack RJ, Al-Ugaily LH, Widdicombe JG. The innervation of the trachea and extrapulmonary bronchi of the mouse. *Cell Tissue Res.* 1984;238:61–8.

Pacaud P, Bolton TB. Relation between muscarinic receptor cationic current and internal calcium in guinea-pig jejunal smooth muscle cells. *J. Physiol.* 1991;441:477–499.

Pacaud P, Loirand G, Baron A, Mironneau C, Mironneau J. Ca^{2+} channel activation and membrane depolarization mediated by Cl^{-} channels in response to noradrenaline in vascular myocytes. *Br. J. Pharmacol.* 1991;104:1000–1006.

Pack RJ, Richardson PS. The aminergic innervation of the human bronchus: a light and electron microscopic study. *J Anat* 1984;138:493-502.

Page CP, Spina D. Selective PDE inhibitors as novel treatments for respiratory diseases. *Curr Opin Pharmacol.* 2012;12:275–86.

Palfreyman MN, Souness JE. Phosphodiesterase type IV inhibitors. *Prog Med Chem.* 1996;33:1-52.

Patakas D, Maniki E, Tsara V, Dascalopoulou E: Nifedipine treatment of patients with bronchial asthma. *J Allergy ClinImmunol* 1987;79:959–963.

Patel K R and Al-Shamma M. Effect of nifedipine on histamine reactivity in asthma. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1982;284:1916.

Pauwels R, O'Byrne PM. Clinical studies of β_2 -agonists in Adults. *2-Agonists in Asthma Treatment*. New York: Marcel Dekker Inc. 1997;83-317.

Peel SE, Liu B, Hall IP. A key role for STIM1 in store operated calcium channel activation in airway smooth muscle. *Respir Res.* 2006;7:119.

Penn RB, Panettieri RA Jr, Benovic JL: Mechanisms of acute desensitization of the beta-2AR-adenylyl cyclase pathway in human airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998;19:338–348.

Penn RB. Embracing emerging paradigms of G protein-coupled receptor agonism and signaling to address airway smooth muscle pathobiology in asthma. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2008;378:149-69.

Pennock BE, Cox CP, Rogers RM, Cain WA, Wells JH. A noninvasive technique for measurement of changes in specific airway resistance. *J Appl Physiol.* 1979;46:399–406.

Persson CG, Erjefalt JS, Korsgren M, Sundler F. The mouse trap. *Trends Pharmacol Sci.* 1997;18:465–7.

Persson CG. Con: mice are not a good model of human airway disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166:6–7.

Poolson, JB, Kazanowski JJ, Goldman AL, Szentivanyi A. Inhibition of human pulmonary phosphodiesterase activity by therapeutic levels of theophylline. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1978;5:535–539.

Pösch G, Kukovetz WR Papaverine-induced inhibition of phosphodiesterase activity in various mammalian tissues. *Life Sci I.* 1971;10:133-44.

Preuss JM, Goldie RG. Muscarinic cholinceptor subtypes mediating tracheal smooth muscle contraction and inositol phosphate generation in guinea pig and rat. *Eur J Pharmacol.* 1999;372:269–77.

Pyne NJ, Grady MW, Shehnaz D, Stevens PA, Pyne S, Rodger IW. Muscarinic blockade of beta-adrenoceptor-stimulated adenylyl cyclase: the role of stimulatory and inhibitory guanine-nucleotide binding regulatory proteins (Gs and Gi) *Br J Pharmacol.* 1992;107:881–7.

Rabe, KF, Magnussen H, Dent G. Theophylline and selective PDE inhibitors as bronchodilators and smooth muscle relaxants. *Eur. Respir. J.* 1995;8:637–642

Raeburn D, Hay DW, Muccitelli RM, Dey RD, Fedan JS. The development of tone in the smooth muscle of guinea-pig isolated tracheal preparations may be induced by prostanoids released from the adjacent airway cartilage. *Prostaglandins.* 1987;33:651-661

Rall TW, Sutherland EW. Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J Biol Chem.* 1958;232:1065-76.

Rasmussen H. Cell communication, calcium ion, and cyclic adenosine monophosphate. *Science.* 1970;170:404–412.

Ressmeyer AR, Larsson AK, Vollmer E, Dahlen SE, Uhlig S, Martin C. Characterisation of guinea pig precision-cut lung slices: comparison with human tissues. *Eur Respir J.* 2006;28:603–11.

- Robichaud** A, Stamatiou PB, Jin SL, et al. Deletion of phosphodiesterase 4D in mice shortens alpha (2)-adrenoceptor-mediated anesthesia, a behavioral correlate of emesis. *J Clin Invest.* 2002;110:1045–52.
- Robison** GA, Butcher RW, Sutherland EW. Cyclic AMP *Annu Rev Biochem.* 1968;37:149–74.
- Roffel** AF, Meurs H, Elzinga CR, Zaagsma J. Muscarinic M2 receptors do not participate in the functional antagonism between methacholine and isoprenaline in guinea pig tracheal smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 1993;249:235–8.
- Roux** E, Molimard M, Savineau JP, Marthan R. Muscarinic stimulation of airway smooth muscle cells. *Gen Pharmacol.* 1998 Sep;31(3):349-56.
- Said** SI. Vasoactive intestinal polypeptide in the respiratory tract. In: Kaliner MA, Barnes PJ, Kunkel GHH, Baraniuk JN, eds. *Neuropeptides in Respiratory Medicine.* New York: Marcel Dekker, Inc., 1994; 143±160.
- Salari** H, Yeung M, Howard S, Schellenberg RR. Increased contraction and inositol phosphate formation of tracheal smooth muscle from hyperresponsive guinea pigs. *J Allergy Clin Immunol.* 1992;90:918–26.
- Sakula** A. Henry Hyde Salter (1823-71): a biographical sketch. *Thorax.* 1985 Dec; 40(12): 887–888.
- Salathe**, M. Effects of beta-agonists on airway epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 110:275–281.
- Sato** M, Nagao T, Yamaguchi I, Nakajima H, Kiyomoto A. Pharmacological studies of a new 1,5-benzothiozepine derivative (CRD-401). Cardiovascular action. *Arzneimittelforsch* 1971;21:1338.
- Savel** J, Rapport d' expertise pharmacologique de la substance NO-SPA Chinoin documentation, II/115-127, 1980
- Sekiguchi** F, Shimamura K, Sunano S. Effects of cyclopiazonic acid and thapsigargin on electromechanical activities and intracellular Ca²⁺ in smooth muscle of carotid artery of hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 1996;118:857–864.
- Shahidi** N and FitzGerald JM. Current recommendations for the treatment of mild asthma. *J Asthma Allergy.* 2010; 3:169–176.
- Sharon** E. Effect of theophylline on membrane potential and contractile force in hamster diaphragm muscle in vitro. *J Clin Invest.* 1986;77:638–640.
- Shen** B, Kwan HY, Ma X, Wong CO, Du J, Huang Y, Yao X. cAMP activates TRPC6 channels via the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-protein kinase B (PKB)-mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)-ERK1/2 signaling pathway. *J Biol Chem.* 2011;286:19439-45.
- Shikada** K, Yamamoto A, Tanaka S. Effects of phosphodiesterase inhibitors on vasoactive intestinal peptide-induced relaxation of isolated guinea-pig trachea. *Eur J Pharmacol.* 1991;195: 389-394.

Shimizu K, Yoshihara E, Takahashi M, Gotoh K, Orita S, Urakawa N, Nakajyo S. J Mechanism of relaxant response to papaverine on the smooth muscle of non-pregnant rat uterus. *Smooth Muscle Res.* 2000;36:83-91.

a, Shimohira M, Nagasaka Y, Ho JÓ, M, Yoshifune, S Effect of NO-SPA and Papaverine on isolated atria and aorta in rabbits, *Chinoin documentation*, 1980;II/150-160.

b, Shimohira, M., Yoshida, Y., Shimizu, K., Pharmacological screening tests on Gastrixon and NO-SPA (I). Effect on the contraction of stomach or gallbladder and gastrointestinal propulsion of charcoal meal, *Chinoin documentation*. 1980;II/128-138.

Small RC. Electrical slow waves and tone of guinea-pig isolated trachealis muscle: effects of drugs and temperature changes. *Br J Pharmacol.* 1982; 77:45-54

Small RC, Boyle JP, Duty S, Elliott KR, Foster RW, and Watt AJ. Analysis of the relaxant effects of AH 21-132 in guinea-pig isolated trachealis. *Br J Pharmacol.* 1989;97:1165–1173.

Snyder DW, Krell RD. Pharmacological evidence for a distinct leukotriene C4 receptor in guinea-pig trachea. *J Pharmacol Exp Ther.* 1984;231:616–22

Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 1994; 372:231-236.

Sutherland EW, Rall TW (1958). Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem.* 232:1077–1091.

Tam EK, Franconi GM, Nadel JA, Caughey GH. Protease inhibitors potentiate smooth muscle relaxation induced by vasoactive intestinal peptide in isolated human bronchi. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1990;2:449-452.

Teixeira MM, Gristwood RW, Cooper N, Hellewell PG. Phosphodiesterase (PDE)4 inhibitors: anti-inflammatory drugs of the future? *Trends Pharmacol Sci.* 1997;18:164-171.

Thirstrup S, Nielsen-Kudsk JE, Møllekjær S. Involvement of K⁺ channels in the relaxant action of vasoactive intestinal peptide and atrial natriuretic peptide in isolated guinea-pig trachea. *Eur J Pharmacol.* 1997;319:253-259.

Tomita T. Electrical Properties of Airway Smooth Muscle. Coburn RF, ed. *Airway Smooth Muscle in Health and Disease.* 1989;151-167.

Tomiyama, A., Takayanagi, I, Takagi, K. Relaxation of intestinal smooth muscle and calcium movements. *J. Pharm. Pharmac.* 1973;25:65-68

Torphy TJ. Phosphodiesterase isozymes: molecular targets for novel antiasthma agents. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:351–70

Tömösközi Z, Finance O, Arányi P. Drotaverine interacts with the L-type Ca⁽²⁺⁾ channel in pregnant rat uterine membranes. *Eur J Pharmacol.* 2002;449:55-60.

Twiss MA, Harman E, Chesrown S, Hendeles L: Efficacy of calcium channel blockers as maintenance therapy for asthma. *Br J Clin- Pharmacol.* 2002;53:243–249.

Uzunov P, Weiss B Separation of multiple molecular forms of cyclic adenosine-3',5'-monophosphate phosphodiesterase in rat cerebellum by polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta.* 1972;284:220–226.

- Vestbo J**, Hurd SS, Agustí AG, Jones PW, Vogelmeier C, Anzueto A, Barnes PJ, Fabbri LM, Martinez FJ, Nishimura M, Stockley RA, Sin DD, Rodriguez-Roisin R. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187:347-65.
- Watson N**, Magnussen H, Rabe KF. Inherent tone of human bronchus: role of eicosanoids and the epithelium. *Br J Pharmacol*. 1997;121:1099-1107.
- Welling**, A., Bosse, E., Ruth, P., Bottlender, R., Flockenzi, V., Hoffman, F.: Expression and regulation of cardiac and smooth muscle calcium channels. *Jpn J Pharmacol*. 1992;58:258–262.
- Widdicombe JH**, Chen LL, Sporer H, Choi HK, Pecson IS, Bastacky SJ. Distribution of tracheal and laryngeal mucous glands in some rodents and the rabbit. *J Anat*. 2001;198:207–21.
- Widdicombe JG**. Regulation of tracheobronchial smooth muscle. *Physiol Rev*. 1963;43:1-37.
- Wu**, C, Sui G, Fry, C, H. The role of the L-type Ca²⁺ channel in refilling functional intracellular Ca²⁺ stores in guinea-pig detrusor smooth muscle. *J Physiol*. 2002 Jan 15; 538(Pt 2): 357–369.
- Yamanaka J**, Nishimura J, Hirano K, Kanaide H: An important role for the Na⁺-Ca²⁺ exchanger in the decrease in cytosolic Ca²⁺ concentration induced by isoprenaline in the porcine coronary artery. *J Physiol*. 2003;549:553–562.
- Yan C**, Miller CL, Abe J. Regulation of phosphodiesterase 3 and inducible cAMP early repressor in the heart. *Circ Res*. 2007;100:489-501.
- Yasue H**, Omote S, Takizawa A, Nagao M, Miwa T, Tanaka S: Exertional angina pectoris caused by coronary spasm: effects of various drugs. *Am J Cardiol*. 1979;43:647-52
- Zindal SK**, Kashyap S, Malik SK. Airway response to methacholine inhalation in asymptomatic male smokers. *Ind J Chest Dis*. 1985;27:225-29.
- Zhang SL**, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Ellisman MH et al. STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. *Nature*. 2005;437:902–905.

11. Tárgyszavak

Tárgyszavak

- Ca^{2+}
- cAMP
- drotaverin
- kalcium újratöltődés
- légúti simaizom
- L-VOCC
- PDE
- szervfürdő
- tengerimalac légcsőpreparátum

Key words

- Ca^{2+}
- cAMP
- drotaverine
- calcium refill
- airway smooth muscle
- L-VOCC
- PDE
- organ bath
- guinea pig isolated trachea

12. Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném megköszönni témavezetőmnek Prof. Dr. Guttman Andrásnak, a Horváth Csaba Elválasztástudományi Laboratórium igazgatójának, hogy doktori értekezésem elkészítését lehetővé tette.

Hálás köszönettel tartozom Dr. Mikus Endrének a LabMagister Kft. ügyvezető igazgatójának munkám során nyújtott szakmai irányításáért és támogatásáért.

Köszönetemet fejezem ki a Horváth Csaba Elválasztástudományi Laboratórium és a LabMagister Kft. munkatársainak, akik segítettek a munkámat.

Végül, de nem utolsó sorban külön köszönöm feleségemnek, családomnak, akik megteremtették azt a biztos magánéleti háttérrel, mely nélkülözhetetlen volt doktori munkám elvégzéséhez.

13. Függelék



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/172/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Patai Zoltán
Neptun kód: IGZNKV
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Patai, Z.**, Guttman, A., Mikus, E. G.: Assessment of the Airway Smooth Muscle Relaxant Effect of Drotaverine.
Pharmacology. 101 (3-4), 163-169, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000485921>
IF: 1.442 (2016)
2. **Patai, Z.**, Guttman, A., Mikus, E. G.: Potential L-Type Voltage-Operated Calcium Channel Blocking Effect of Drotaverine on Functional Models.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 359 (3), 442-451, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.116.237271>
IF: 3.867

További közlemények

3. Kovács, A. L., **Patai, Z.**, Guttman, A., Kádas, J., Takács, L., Kurucz, I.: Fractionation of the human plasma proteome for monoclonal antibody proteomics-based biomarker discovery 2: antigen identification by dot blot array screening.
Electrophoresis. 34 (20-21), 3064-3071, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201200677>
IF: 3.161

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 8,47

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 5,309

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudomány-metriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2018.05.23.

