

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

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.

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: **Patai Zoltán** okleveles molekuláris biológus.

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Guttman András, az MTA doktora, az MTA külső tagja

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

tagok: Dr. Csósz Éva, PhD

Dr. Sipeki Szabolcs, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem, ÁOK Élettani Intézet, I. emelet, könyvtár,
2018 december 17. 10:00

Az értekezés bírálói:

Dr. Brunyánszki Attila, PhD

Dr. Tábi Tamás, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

tagok: Dr. Brunyánszki Attila, PhD

Dr. Tábi Tamás, PhD

Dr. Csósz Éva, PhD

Dr. Sipeki Szabolcs, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A”
épület tanterme, 2018. december 17. 13:00

1. Bevezetés

A drotaverin 1962 óta van jelen a magyar gyógyszerpiacon, elsődlegesen, mint görcsoldószert. 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 foszfodiesteráz (PDE) enzim gátló hatásának felfedezése után hamarosan kiderült, hogy a drotaverin is gátolja a foszfodiesteráz 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 tesztek 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.

2. 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 vizsgáljam 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 újra telíteni 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 kontraktúra 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.

3. Anyagok és Módszerek

3.1. 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-metilkolin-kloridot, hisztamint-dihidrokloridot, D-(+)-glükózt Sigma-tól (St Luis, MO) szereztük be.

3.2. Légcső izolálása és preparációja szervfürdőhöz

A kísérletekhez 300-350 g testtömegű hím Dunkin-Hartley tengerimalacokat használtunk. Az állatokat pentobarbitállal elaltattuk, majd a mély alvásban lévő állatból kimetszettük a légcsövet és egy előre elkészített Krebs-Henseleit oldatot tartalmazó preparáló tálba helyeztük. A légcsőből 3-4 porcgűrű szélességű karikákat készítettünk, amelyet a simaizommal átellenes oldalon átmetszettünk és szétnyitottunk. 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. Az izometrikus kontrakciót egy erősítővel ellátott erőmérő segítségével mértük. Egy tengerimalacból összesen nyolc preparátumot készítettünk, amelyeket ugyanazon a napon ugyanabban a kísérletben használtunk fel. A nyolc preparátumból négy szolgált kontrollként, négy pedig a kiválasztott teszt anyagok egyikét kapta.

3.3. KCl kiváltotta kontrakció vizsgálata

A normál Krebs-Henseleit oldatban való inkubációs idő lejárta után a trachea preparátumok kontrakcióját KCl növekvő dózisainak (20, 30, 50 mM) egymásra adásával, 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.

3.4. 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 / nifedin / 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 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.

3.5. 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. Ca^{2+} -mentes oldatban 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 hozzáadtuk 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 az 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.

3.6. 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 analógiájának 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 izomösszehúzást 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 az extracelluláris Ca^{2+} megkötésére minden egyes preparátum szervfürdőjébe.

3.7. 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 preparátumot 3×10^{-6} M hisztaminnal, vagy 5×10^{-7} M metakolinnal, vagy 20 mM KCl-al összehúzódást 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 szervfürdőbe 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.

3.8. 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 GraphPad Prism 6 szoftvert használtunk.

4. Eredmények és megbeszélés

4.1. KCl kiváltotta kontrakció vizsgálata

Az első lépésben a KCl depolarizáció kiváltotta simaizom kontrakción hasonlítottuk össze a drotaverin hatását ismert L-VOCC gátló és PDE blokkoló anyagokéval. A KCl koncentrációját három lépésben kumulatív módon növelve váltottuk ki kontrakciót. Az L-VOCC blokkoló nifedipinnel és diltiazemmel történő előkezelés hatására a KCl kiváltotta simaizom kontrakciók maximum értékei csökkenést mutattak. Ez az eredmény várható volt, mivel *in vitro* a Ca^{2+} csatorna blokkolók képesek szelektíven meggátolni a membrán depolarizációt követő Ca^{2+} beáramlást és ennek nyomán a simaizom kontrakciót. Teofillin a PDE enzimek nem szelektív gátlása révén cAMP koncentráció növekedést okoz, amely a protein kináz A-n (PKA) aktivációjával a nagy vezetőképességű Ca^{2+} -aktivált K^+ csatornák (K_{Ca} csatorna) foszforilálásán és a SERCA Ca^{2+} felvételének fokozásán keresztül direkt módon csökkenti az intracelluláris kalciumot ($\text{Ca}^{2+}_{\text{i}}$).

Eredményeink azt mutatják, hogy a teofillin koncentrációjának növelésével hiába emelkedik az intracelluláris cAMP koncentráció, nincs jelentős hatással a KCl depolarizáció kiváltotta simaizom kontrakcióra, amely bizonyítottan L-VOCC-n keresztüli Ca^{2+} influx vált ki. A papaverin és drotaverin koncentráció-függő módon gátolta a KCl kiváltotta simaizom kontrakciót, amely inkább magyarázható az L-VOCC-n keresztüli Ca^{2+} influx gátlásával, mintsem a cAMP-PKA útvonalakon keresztüli ($\text{Ca}^{2+}_{\text{i}}$) csökkenéssel. Ezen feltevést erősítik meg a teofillin-nifedipin keverék esetében kapott eredmények, amelyek szerint a PDE gátló hatást kiegészítve L-VOCC blokkoló hatással, felülmúlja a L-VOCC gátlók hatását.

4.2. Drotaverin hatásának vizsgálata nyugalmi Ca^{2+} raktárak újratöltődésére

A kísérleti modellben kihasználtuk azt a jelenséget, hogy az allergiás asztmában fontos patológiás szerepet játszó hisztamin és metakolin az intracelluláris Ca^{2+} -szint függvényében vált ki különböző erősségű kontrakciót. Metakolin (M3 agonista) illetve a hisztamin (H1 agonista) adekvát 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 van. Ezt támasztja alá az is, hogy az L-VOCC blokkolók gyakorlatilag hatástalanok az agonista által kiváltott légső kontrakcióra. Az eredmények azt mutatták, hogy a Ca^{2+} -mentes Krebs-Henseleit oldatban az ismételt hisztamin, vagy metakolin hatására a kontrakció fokozatosan csökkent, majd újratöltődést

követően a Ca^{2+} -mentes oldatban az agonisták ismét képesek voltak maximumhoz közeli kontrakciót kiváltani. Ezek az adatok azt a hipotézisünket támasztják alá, mely szerint az intracelluláris raktáron keresztüli Ca^{2+} felszabadulás kiváltotta kontrakció mediátor független, mivel mind a hízósejtek granulumaiból felszabaduló hisztamin, mind az M3 receptor agonista metakolin ugyanazt a hatást váltotta ki a kísérleteinkben. Adatok is azt bizonyították, hogy a L-VOCC blokkoló nifedipin gátolja, amíg a PDE gátló teofillin nem befolyásolta a nyugalmi Ca^{2+} újratöltődést. A modellen kimutattuk, hogy a drotaverin képes hatást gyakorolni a nyugalmi Ca^{2+} felvételre, mivel jelenlétében nem volt képes a preparátum a kontrakcióhoz elegendő mennyiségű Ca^{2+} felvételére. Hatása ezáltal hatása inkább hasonlít az L-VOCC gátló nifedipinhez és diltiazemhez, mint a PDE gátló teofillinhez, amely segítette, mintsem gátolta a kontrakciót.

4.3. A CaCl_2 kiváltotta kontrakció vizsgálata

Ebben a kísérletben azt vizsgáltuk, hogy a kiürített intracelluláris Ca^{2+} raktárak mellett, az extracelluláris Ca^{2+} pótlás utáni Ca^{2+} beáramlás milyen kinetikával zajlik agonista jelenlétében. Az alap feltevésünk az volt, hogy az extracellulárisan adott Ca^{2+} az L-VOCC-n keresztül Ca^{2+} influxot okoz. A 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 dózisának hozzáadásával. Nem tapasztaltunk eltérést a kontrakció időbeli kialakulásában sem attól függően, hogy normál Ca^{2+} -szint jelenlétében konstriktor agonistát alkalmaztunk, vagy kiürített Ca^{2+} raktár mellett agonista jelenlétében CaCl_2 -ot adtunk a preparátumokhoz. Ez arra engedett következtetni, hogy a Ca^{2+} a ROC és L-VOCC-n keresztül ugyanolyan hatékonyan penetrál a sejtekbe hisztamin és metakolin jelenlétében is. Az L-VOCC szerepét a receptor aktiválta folyamatban bizonyítottuk, mivel az L-VOCC blokkoló nifedipin és diltiazem a Ca^{2+} beáramlás gátlásán keresztül csökkentette a CaCl_2 kiváltotta simaizom kontrakció kialakulásának sebességét. A drotaverin és a papaverin is késleltette a kontrakció időbeli kialakulásának a sebességét, ellenben a kontrakció maximumára alig voltak hatással. A drotaverin és papaverin ezen hatása hasonlatos volt a L-VOCC blokkoló vegyületekéhez. A PDE gátló teofillin nem csökkentette sem a kontrakció kialakulásának sem sebességét, sem pedig annak maximumát, ellenben kiegészítve nifedipinnel, az L-VOCC és PDE gátló hatás összeadódva erősen gátolta a kontrakció kialakulásának a sebességét. Az alkalmazott kísérleti módszerrel ezáltal a drotaverin

funkcionális L-VOCC blokkoló képességét mutattuk ki, melyben a PDE gátlás nem játszott szerepet.

4.4. Összehúzott preparátum ernyesztése

A légúti megbetegedések közös jellemzője a nehézlégzés, fulladás, amelynek leggyakoribb kiváltó okai közé tartozik a hörgőszűkület okozta légáram csökkenése. Mivel a légcső összehúzódás aktivációjában kulcsszerepet játszik az ioncsatornákon beáramló Ca^{2+} , ezért az L-VOCC blokkolókkal már számos *in vivo* és *in vitro* kísérletet végeztek légcső elzáródásos modellen. Ennél fogva logikusnak tűnt, hogy a drotaverin feltételezett L-VOCC-PDE gátló együttes hatását három kontrakciós mediátor, KCl, hisztamin és metakolin segítségével teszteljük tovább. Eredményeink igazolták a korábbi irodalmi adatokat, amely szerint a nifedipin hatáserőssége nagyobb volt a KCl depolarizáció kiváltotta kontrakción, mint a hisztamin és metakolin összehúzott légcső simaizmon.

A kísérleteink során a drotaverin hasonlóan a nifedipinhez, dózisfüggő módon ernyesztette mind a három mediátor kiváltotta kontrakciót és hatáserőssége nagyobb volt a KCl által összehúzott preparátumon, szemben a hisztamin, vagy metakolin előidézett kontrakción. A teofillin képes volt ernyeszteni mind a három mediátor kiváltotta kontrakciót, viszont hatáserősségbeli eltérést nem mutatott egyik konstriktor esetében sem.

Az eredményeink alapján megállapítható, hogy a PDE gátló teofillin nem mutat a drotaverinhez hasonló mediátor függő hatást, amely megerősíti, hogy a drotaverin a PDE gátlás mellett rendelkezik funkcionálisan L-VOCC-ra gyakorolt blokkoló hatással.

4.5. Kontrakció kialakulásának a gátlása

A már kialakult hörgőszűkület relaxálásán kívül igen fontos a kialakulásának a megakadályozása. A nifedipin képes a hisztamin, valamint a magas K^+ és Ca^{2+} kiváltotta kontrakció kialakulását gátolni, azonban hatáserőssége körülbelül két nagyságrenddel nagyobb extracelluláris K^+ koncentráció okozta kontrakció gátlásában, mint a receptor agonista kiváltotta kontrakcióban. Eredményeink nagy egyezést mutattak az irodalmi adatokkal, mivel a nifedipin koncentrációfüggő módon akadályozta a hisztamin és a metakolin kiváltotta kontrakciót, de hatáserőssége négy nagyságrenddel nagyobb volt a magas K^+ koncentráció segítségével előidézett Ca^{2+} influx kiváltott kontrakción. A drotaverin tesztelése során megfigyeltük, hogy hasonlóan a nifedipinhez, a kontrakciót megelőzően beadva a szervfürdőbe képes gátolni az agonisták kiváltotta kontrakciót. Sikerült kimutatni az

L-VOCC- blokkolókra jellemző hatást is, mivel metakolinra és hisztaminra vonatkozó EC_{50} értékek egymáshoz nagyon közeliek voltak, míg a KCl kontrakción a hatásereősége egy nagyságrenddel nagyobbak bizonyult.

A teofillin magas, 100 μ M dózisban ugyan képes volt a preparátum ernyesztésére, de a dózis további emelése tartósan fennmaradó kontrakciót okozott az összes preparátumon, ezért a dózis-hatás függés a továbbiakban nem volt vizsgálható. Erre a jelenségre az irodalomban kerestem választ. A teofillin metilxantin szerkezetű gyógyszeranyag, ezért szerkezetileg rokon vegyületnek tekinthető a szintén metilxantin-származék koffeinnel, amelyről leírták, hogy képes az intracelluláris raktárakban tárolt Ca^{2+} felszabadítására. Egy másik lehetséges magyarázat szerint a teofillin Ca^{2+} influxot idéz elő, amely valószínűleg a K^+ csatornák aktiválásán keresztül hiperpolarizálja a membránt. Ezt a hipotézist támasztja alá az is, hogy a verapamil képes blokkolni a koffein hatását, amely SR-ből Ca^{2+} szabadít fel viszont a teofillinre nincs hatással.

5. Összefoglalás

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+} antagonistá 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 újratöltésében 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.



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

Jelölt: Patai Zoltán
Neptun kód: IGZNV
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 tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2018.05.23.

