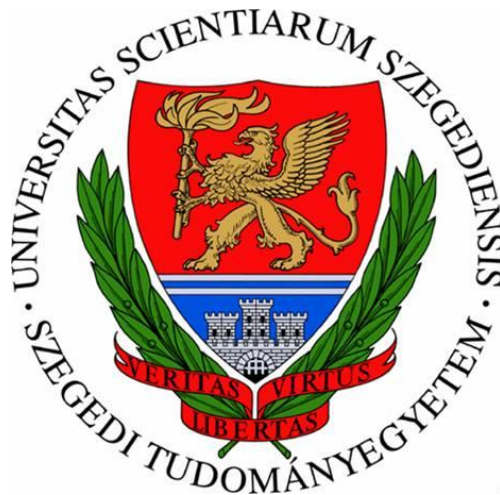


# **Az automata patch-clamp rendszerek szerepe a gyógyszerkutatás-fejlesztésben**

**Orvos Péter, M.Sc.**

**Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei**



**Szeged**

**2016**

# **Az automata patch-clamp rendszerek szerepe a gyógyszerkutatás-fejlesztésben**

**Orvos Péter, M.Sc.**

**Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei**

**Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola**

**Témavezető: Dr. Virág László, Ph.D.**

**Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar**

**Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet**

**Szeged**

**2016**

# 1. BEVEZETÉS

## 1.1. Az ioncsatornák szerepe a gyógyszerkutatás-fejlesztésben

Az ioncsatornák olyan transzmembrán fehérjék, melyek a sejtek és sejtorganellek membránjában pórust képezve lehetővé teszik a szerves ionok szelektív, rendkívül gyors, passzív transzportját.

Az ioncsatornáknak alapvető szerepe van számos fiziológiai folyamat szabályozásában, ezért a csatornák hibás működése súlyos megbetegedésekhez vezethet. Az ilyen típusú megbetegedések kezelése elsősorban az ioncsatornák farmakológiai tulajdonságait módosító gyógyszerekkel történik. Az ioncsatornák gyakori molekuláris célpontjai a gyógyszeres terápiának, tanulmányozásuk ezért kiemelkedően fontos mind az akadémiai alapkutatásban, mind a gyógyszeripar számára.

A gyógyszerkutatási programok másik fontos részét képezi a gyógyszerjelölt molekulák biztonságfarmakológiai vizsgálata, különös tekintettel a kardiovaszkuláris mellékhatásokra. Számos vegyület aritmogén hatást fejt ki a kamrai miocitákban expresszáldó hERG (*human ether-a-go-go-related gene*) ioncsatornákon keresztül. A hERG csatornák gátlása meghosszabbítja a szív akciós potenciáljának repolarizációs periódusát, ennek következtében növeli a halálos kimenetelű kamrai ritmuszavarok kialakulásának valószínűségét.

## 1.2. Az ioncsatorna-kutatás módszerei

A rendelkezésre álló módszerek korlátai miatt az ioncsatornák vizsgálata sokáig komoly nehézségekbe ütközött, emiatt - fiziológiás jelentőségük és terápiás fontosságuk ellenére - kevéssé tanulmányozott gyógyszer célcsoportot képeztek. Az elérhető technológiák nem biztosították párhuzamosan a magas áteresztőképességet és az adatok jó minőségét, és kompromisszumot kötöttek a nagy áteresztőképesség és a magas információtartalom között.

### 1.2.1. Intracelluláris mikroelektród technika

Az intracelluláris mérések során elektromosan vezető médiummal feltöltött üveg mikroelektródát vezetnek a sejtmembránon keresztül a sejttestbe. A módszer alkalmas a belső környezet és egy külső referencia pont közötti feszültségkülönbség regisztrálására.

### 1.2.2. Manuális patch-clamp módszer

Napjainkban az ioncsatornák leggyakoribb és legpontosabb elektrofiziológiai vizsgálati módszere a patch-clamp technika. Az Erwin Neher és Bert Sakmann által az 1970-es évek

végén kidolgozott módszer során egy boroszilikát üvegapilláris mikroelektród a sejt felszínéhez tapad, lehetővé téve a körbezárt ioncsatornákon keresztül folyó áram mérését. Kifejlesztését követően a patch-clamp vált a 'gold standard' eljárássá az ioncsatornák viselkedésének, működésének, kinetikájának és farmakológiájának *in vitro* tanulmányozásában, mind natív, mind tenyésztett emlős sejteken.

A patch-clamp az egyetlen közvetlen, információgazdag és valós idejű technológia az ioncsatornák viselkedésének, működésének és szabályozásának vizsgálatára. A kitűnő minőségű adatok ellenére, a rendkívül alacsony áteresztőképesség kizárja a manuális patch-clamp-et a gyógyszerfejlesztés és optimalizálás korai szakaszaiból, hiszen ezek a fázisok jóval nagyobb áteresztőképességet követelnek.

### **1.2.3. Ioncsatorna vizsgálatok nagy áteresztőképességű rendszerekkel**

A manuális patch-clamp módszer korlátai miatt a nagy áteresztőképességű technikák szintén szükségesek és szerves részévé váltak a gyógyszerfejlesztési programok korai fázisainak. Ezek a módszerek ligandkötésen, radioaktív, vagy fluoreszcens (ion- vagy feszültség-érzékeny festékekkel) jelzéseken alapulnak. Ezek a megközelítések többnyire kompatibilisek az elsődleges szűrés követelményeivel, és hasznosak lehetnek gyógyszerjelölt molekulák azonosításában és jellemzésében, azonban az adatminőséget feláldozzák az áteresztőképességért. A legtöbb ilyen módszer kis pontosságú, alacsony érzékenységgű és alacsony időbeli felbontással rendelkezik.

### **1.2.4. Automata patch-clamp módszer**

Az elmúlt években számos cég fejlesztett és vezetett be a piacon automatizált patch-clamp berendezéseket, melyek alkalmasak a gyors és kiváló minőségű szűrésre valamint az ioncsatornákra ható gyógyszerjelölt molekulák optimalizálására. Az üveg mikroelektród alapú mérések automatizálására a 1990-es évek végén történtek az első kísérletek, mely próbálkozásokat az alacsony sikerességi arány és áteresztőképesség jellemezte. Az igazi áttörést a mikromanipuláció és vizuális kontroll nélküli planáris patch-clamp technológia bevezetése és kereskedelmi szempontból életképesé válása jelentette. A módszer során, negatív nyomás alkalmazásával a szuszpenzióban lévő sejtek mozdulnak el a patch-clamp szubsztrát irányába. A planáris technika felváltotta az üveg pipetta elektródákat, így lehetővé téve a magasabb áteresztőképességű szűrést. Jelenleg ezt a technológiát alkalmazza a legtöbb automatizált rendszer.

### **1.3. Célkitűzések**

Az értekezés célja az automatizált patch-clamp technika szerepének vizsgálata a gyógyszerkutató és -fejlesztés során, és összehasonlítása a hagyományos celluláris elektrofiziológiai módszerekkel. A vizsgálatoknak két fő szempontja volt:

1. Ioncsatornákat stabilan expresszáló sejtvonalakban automatizált patch-clamp módszerrel szerzett szűrési eredmények értékének felmérése, meghatározása. Ebben a munkafázisban a fő cél az volt, hogy felbecsüljük a vizsgált automatizált patch-clamp berendezés használhatóságát a különböző szűrési projektek során. A rendszer alkalmasságát az aktív vegyületeknek a szűrésre használt sejtvonalakban automata módszerrel, illetve a natív sejtekben konvencionális elektrofiziológiai technikákkal mért hatásainak összehasonlításával vizsgáltuk.
2. Az automata patch-clamp módszerrel nyert biztonságfarmakológiai adatok értékének felmérése, elemzése. A munka ezen fázisának fő célja volt az automata patch-clamp berendezéssel, stabil sejtvonalak alkalmazásával kapott eredmények gyakorlati használhatóságának és a biológiai jelentőségének tanulmányozása.

## **2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### **2.1. Mikroelektród technika**

A kísérletekhez 1-2 kg súlyú New Zealand fajtájú nyulakat vagy 8-14 kg súlyú keverék kutyákat használtunk. A kipreparált jobb kamrai papilláris izmot szervfürdőben rögzítettük. Kezdetben a preparátumokat bipoláris platina elektródon keresztül 2 ms időtartamú négyszögimpulzusokkal ingereltük. A transzmembrán akciós potenciálokat 5-20 M $\Omega$  ellenállású, 3 M-os KCl-dal feltöltött, konvencionális üvegapilláris mikroelektródon keresztül nagy impedanciájú elektrométerbe vezettük (Experimetria 309), majd oszcilloszkóp segítségével monitoroztuk.

### **2.2. Manuális patch-clamp**

A bal kamrai miocitákat enzimatis emésztés során nyertük ki 1-2 kg súlyú New Zealand fajtájú nyulak szívéből retrográd perfúziós technika alkalmazásával. Az 1,5-2,5 M $\Omega$  ellenállású mikropipetták boroszilikát üvegapillárisból (Harvard Apparatus) készültek pipettahúzó berendezés (Flaming/Brown, P-97) használatával. A membránáramokat 37°C –on mértük Axopatch-200B típusú erősítővel (Molecular Devices), a patch-clamp technika egészsejtes konfigurációjában. A membránáramokat 1 kHz-es aluláteresztő filteren szűrtük,

majd analóg-digitális átalakító (Digidata 1322A és 1440A, Molecular Devices) segítségével digitalizáltuk, és szoftveresen rögzítettük (pClamp 8 és 10, Molecular Devices).

### 2.3. Automata patch-clamp kísérletek

Az automata patch-clamp kísérleteket planáris technikával egészsejtes konfigurációban négy csatornás, közepes áteresztőképességű, beépített hőmérséklet-szabályozással rendelkező teljesen automatizált patch-clamp készülékkel (Patchliner Quattro, Nanion, <http://nanion.de/images/stories/pdf/patchliner.pdf>) hajtottuk végre. A natív aktivált humán limfocitákon, valamint a stabilan transzfektált HEK-GABA, HEK-HCN és CHO-Kv1.4 sejtvonalak esetén a kísérleteket szobahőmérsékleten végeztük. A méréseket szobahőmérsékleten és/vagy fiziológias (37°C) hőmérsékleten végeztük HEK-GIRK és HEK-hERG sejtvonalakon.

### 2.4. Statisztika

Az adatok (számtani átlag  $\pm$  SEM) statisztikai elemzése Student-féle páros t-próbával történt. Az eredményeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha P értéke kisebb volt, mint 0,05.

## 3. EREDMÉNYEK

### 3.1. Különböző sejtvonalak vizsgálata és jellemzése a Patchlinerrel

**Natív aktivált humán limfociták:** A Kv1.3 csatorna karakterizálására humán perifériás T limfocitákban tetraetil-ammóniumot (TEA) valamint két szelektív csatornablokkolót, anuroctoxint (AnTx) és margatoxint (MgTx) használtunk. A TEA dóziszfüggő módon csökkentette a Kv1.3 áram nagyságát  $28,14 \pm 3,11$  mM-os IC<sub>50</sub> értékkel. A két skorpióméregből származó, szelektív Kv1.3 blokkoló peptid toxin, az anuroctoxin és a margatoxin szintén koncentráció-függő módon gátolta az áramot. Az IC<sub>50</sub> értékek mindkét toxin esetén igen alacsonyak voltak:  $25,35 \pm 1,64$  nM (AnTx) és  $68,59 \pm 16,68$  pM (MgTx).

**HEK-GABA sejtvonal:** A GABA<sub>A</sub> csatornák vizsgálatát a gyors oldatcsere érdekében az oldatok halmozott (stacked) ráadásával végeztük. A GABA EC<sub>50</sub> értékét  $32,20 \pm 1,85$   $\mu$ M-nak határoztuk meg a Hill-egyenletből. A GABA<sub>A</sub> antagonistá bikukullin hatását szintén tanulmányoztuk a csatornán, az IC<sub>50</sub> értéket  $371,06 \pm 3,43$  nM-nak becsültük.

**HEK-HCN sejtvonal:** Az ivabradin gátló hatását HCN1 és HCN4 csatornákat expresszáló HEK sejteken teszteltük. 10  $\mu$ M koncentrációjú ivabradin mindkét áramot csökkentette,  $64,52 \pm 5,36\%$ -kal (HCN1) és  $63,79 \pm 1,07\%$ -kal (HCN4).

**HEK-GIRK1/4 sejtvonala:** Hat vegyületek hatását vizsgáltuk HEK-GIRK sejteken. Ezeket a kísérleteket szobahőmérsékleten végeztük és az eredményeket a szintén szobahőmérsékleten kivitelezett szűrési projekthez (lásd 3.2 fejezet) használtuk fel. A klorokin, dezipramin, JTV-519, NIP-142, propafenon és kinidin  $IC_{50}$  értékei a következők voltak:  $463,70 \pm 34,61$  nM,  $1,47 \pm 0,17$   $\mu$ M,  $814,24 \pm 109,34$  nM,  $175,75 \pm 8,59$  nM,  $372,99 \pm 27,69$  nM és  $5,04 \pm 0,62$   $\mu$ M. Az antiaritmiás gyógyszer amiodaron és krónikus kezelés során képződő fő metabolitja, a dezetilamiodaron (DEA) hatását szintén tanulmányoztuk. Ezeket a vizsgálatokat – szívelektrofiziológiai tanulmány részeként – 37°C-on végeztük. A Patchlinerrel meghatározott  $IC_{50}$  értékek közel azonosak voltak ( $1,77 \pm 0,18$   $\mu$ M és  $1,82 \pm 0,15$   $\mu$ M).

**CHO-Kv1.4 sejtvonala:** A chromanol 293B és a 4-aminopiridin hatását vizsgáltuk Kv1.4 ioncsatornán. Az anyagok becsült  $IC_{50}$  értékei  $85,69 \pm 8,38$   $\mu$ M és  $791,33 \pm 26,84$   $\mu$ M voltak.

**HEK-hERG sejtvonala:** Két vegyületet, a dofetilidet és a szotalolt teszteltük a hERG vizsgálat során automatizált patch-clamp rendszerrel. Az eredményeket a 3.3.1 fejezetben mutatjuk be.

### **3.2. Szűrési programok: Vegyületek ioncsatorna-modulátor képességének vizsgálata automata patch-clamp készülékkel**

A karakterizált sejtvonalaikat a Patchlinerrel végrehajtott szűrési és biztonságfarmakológiai projekteken alkalmaztuk. A szűrési programokat szobahőmérsékleten hajtottuk végre.

#### **3.2.1. Előválogatott kémiai könyvtárak szűrése GIRK csatornán**

Pitvarfibrilláció kezelésére alkalmas szerek felfedezése céljából előválogatott kémiai könyvtárak szűrését hajtottuk végre GIRK csatornát expresszáló sejtvonalon. A szűrési projekt során összesen 868 vegyületet teszteltünk le két koncentrációban (1 és 10  $\mu$ M). Az előválogatott vegyületek kb. 13%-a fejtett ki jelentős (legalább 50%-os) gátló hatást 10  $\mu$ M koncentrációban. A vegyületeket GIRK gátló hatásuk alapján rangsoroltuk, és a leghatékonyabb molekulák közül kiválasztottunk 11-et a hatáserősség és a kémiai szerkezet alapján. Ezen vegyületek dózis-hatás görbéi további részletes kísérletekben kerültek meghatározásra. Ez utóbbi kísérletek alapján kijelöltük a 4 legerősebb GIRK gátló hatással rendelkező anyagot (Ryt-143, Ryt-144, Ryt-230 és Ryt-243 – mindegyik esetén az  $IC_{50} < 0,5$   $\mu$ M) szelektivitás vizsgálatokra HEK-hERG sejtvonalon. A 4 kiválasztott molekulából egy hasonló gátló hatást mutatott mindkét csatornán: a Ryt-243  $IC_{50}$  értékei GIRK és hERG csatornán  $100,14 \pm 5,10$  nM illetve  $47,56 \pm 5,31$  nM voltak. A másik 3 anyag (Ryt-143, Ryt-144, Ryt-230) legalább tízszeres aktivitást mutatott GIRK csatornán,

összevetve a hERG eredményekkel. Az  $IC_{50}$  értékek GIRK és hERG csatornán a következők voltak:  $281,29 \pm 9,48$  nM és  $2,91 \pm 0,29$   $\mu$ M a Ryt-144 esetében,  $335,30 \pm 23,81$  nM és  $8,05 \pm 0,89$   $\mu$ M a Ryt-143 vonatkozásában, végül  $495,43 \pm 15,90$  nM és  $9,16 \pm 1,30$   $\mu$ M a Ryt-230 esetén. Mivel a hERG blokkoló hatás akár hasznos is lehet antiaritmiás kezelések során, a Ryt-243-at további vizsgálatoknak vetettük alá. A hERG gátló hatás ellenére a vegyület nem nyújtotta az akciós potenciált nyúl kamrai preparátumon sem 5  $\mu$ M, sem 10  $\mu$ M koncentrációban. A Ryt-243-at megvizsgáltuk kutya krónikus pitvarfibrilláció modellben is. A vegyület erős antiaritmiás hatást mutatott ezekben a kísérletekben, a pitvarfibrilláció előfordulási gyakorisága 65-70%-kal csökkent mind 0,3 mg/kg, mind 1 mg/kg dózis alkalmazásakor. Az antiaritmiás eredmények alapján szabadalmi kérvényt nyújtottunk be a pitvarfibrilláció kezelésére alkalmas, Ryt-243 hatóanyagú gyógyszerkészítményre vonatkozóan. A GIRK szelektivitással rendelkező anyagokat (Ryt-143, Ryt-144 és Ryt-230) szintén további, antiaritmiás valamint szerkezet-hatás vizsgálatoknak vetettük alá.

### **3.2.2. Növényi eredetű molekulák és kivonatok szűrése GIRK csatornán**

#### **3.2.2.1. Természetes növényi vegyületek szűrése GIRK csatornán**

Természetes forrásból származó vegyületeket szintén vizsgáltunk a GIRK szűrési projekt során. A szűrés ezen fázisában 281 természetes növényi eredetű molekulát vizsgáltuk, melyeket véletlenszerűen jelöltünk ki, nem végeztünk előválogatást. Ezeket az anyagokat is két koncentrációban (1 és 10  $\mu$ M) szűrtük. A természetes molekulák kb. 9%-a fejtett ki jelentős (legalább 50%-os) gátló hatást 10  $\mu$ M koncentrációban. A 26 leghatékonyabb molekulát további vizsgálatoknak vetettük alá az elsődleges szűrést követően. Ezeket a vegyületeket Kv1.4 és hERG sejtvonalon is megvizsgáltuk, ezáltal tanulmányozhattuk GIRK szelektivitásukat. A gátló hatások illetve a kémiai szerkezet alapján 6 természetes növényi molekula (Ryt-963, Ryt-964, Ryt-1009, Ryt-1103, Ryt-1187 and Ryt-1194) került kiválasztásra, melyek dózis-hatás görbéit további részletes kísérletek során határoztuk meg. Az  $IC_{50}$  értékek GIRK csatornán a következők voltak:  $524,25 \pm 35,87$  nM a Ryt-963,  $2,25 \pm 0,33$   $\mu$ M a Ryt-1009,  $3,66 \pm 0,30$   $\mu$ M a Ryt-964,  $5,33 \pm 0,23$   $\mu$ M a Ryt-1194,  $9,68 \pm 0,27$   $\mu$ M a Ryt-1187 és  $12,20 \pm 0,31$   $\mu$ M a Ryt-1103 esetében.

#### **3.2.2.2. Növényi kivonatok szűrése GIRK csatornán**

A biológiailag aktív vegyületek hatáskövetéssel történő azonosítására új módszert dolgoztunk ki. Ennek során *Polygonum persicaria* kivonatot szűrtünk GIRK csatornán azzal a céllal,



hogy azonosítsunk természetes eredetű ígéretes ioncsatorna blokkoló vegyületeket. A szárított növényből hexános, kloroformos, metanolos és vizes extraktumot állítottunk elő. A különböző polaritású kivonatokat két koncentrációban (0.01 és 0.1 mg/l) vizsgáltuk. A kloroformos kivonat jelentős GIRK gátló hatást mutatott, így ebből az extraktumból folyadék-kromatográfiás eljárással 6 frakciót állítottunk elő, melyek GIRK moduláló hatását szintén tanulmányoztuk. A legaktívabb 4. és 5. frakcióból RP-HPLC-vel 4 fő vegyületet tudunk azonosítani tiszta formában. Az egyéb (minor) vegyületeket tartalmazó eluátumokat szintén gyűjtöttük a HPLC kromatográfia során. Az aktív frakciókból izolált fő vegyületek külön-külön és együttesen alkalmazva is csak nagyon mérsékelten gátolták a GIRK csatornát, miközben a HPLC eluátumok aktívnak bizonyultak, jelezve az elektrofiziológiailag aktív molekulák jelenlétét a minor vegyületek közt. Ezen vegyületek azonosítása céljából további vizsgálatok vannak folyamatban. Mindazonáltal a tanulmány megerősíti az alkalmazott módszer használhatóságát biológiai hatással rendelkező aktív vegyületek növényi kivonatokból történő felkutatására, azonosítására.

### **3.3. Biztonságharmakológiai vizsgálatok**

#### **3.3.1. Automatizált patch-clamp berendezéssel végzett hERG vizsgálatok eredményeinek biztonságfarmakológiai vonatkozása, értékelése**

Két anyagot, a dofetilidet és a szotalolt teszteltük szobahőmérsékleten és 37°C-on hERG sejteken automatizált patch-clamp berendezéssel. A dofetilid  $IC_{50}$  értékei nagyon hasonlóak voltak ( $8,41 \pm 0,19$  nM szobahőmérsékleten és  $7,29 \pm 0,16$  nM 37°C-on), míg a szotalol eltérő tulajdonságokat mutatott a két hőmérsékleten. A szotalol  $IC_{50}$  értéke szobahőmérsékleten  $773,74 \pm 9,28$   $\mu$ M volt, azonban 37°C-on jóval erősebb hatást mértünk ( $IC_{50} = 342,84 \pm 24,82$   $\mu$ M). A hERG vizsgálatok valós értékének megállapítása érdekében a két anyag  $I_{Kr}$  gátló hatását is megvizsgáltuk nyúl kamrai miocitákon manuális patch-clamp módszerrel, ahol a dofetilid és a szotalol  $IC_{50}$  értékeit  $13,02 \pm 2,56$  nM-nak és  $51,60 \pm 9,82$   $\mu$ M-nak határoztuk meg. A hERG és  $I_{Kr}$  mérések során meghatározott  $IC_{50}$  értékek jó egyezést mutattak a dofetilid esetében, azonban a szotalolnál a hERG  $IC_{50}$  kb. hétszerese volt az  $I_{Kr}$  mérések során kapott értéknek. A hERG és  $I_{Kr}$  gátlás biztonságfarmakológiai következményeinek tanulmányozásához a dofetilid és a szotalol hatását megvizsgáltuk akciós potenciál kísérletekben is nyúl kamrai preparátumon. 13 nM dofetilide  $47,8 \pm 12,9$  %-kal, míg 52  $\mu$ M szotalol  $56,0 \pm 4,6$  %-kal nyújtotta az  $APD_{90}$ -et.

### 3.3.2. A *Chelidonium majus* kivonatainak és fő alkaloidjainak hatása hERG ioncsatornán és kutya akciós potenciálon

A világszerte elterjedt vérehulló fecskefű (*Chelidonium majus*) fontos növénye a modern fitoterápiának, külsőleg és belsőleg is alkalmazzák. A növény biztonságfarmakológiai tulajdonságai azonban nem tisztázottak, ezért a gyógynövény kivonatainak és alkaloidjainak hERG K<sup>+</sup> csatornára és szív akciós potenciálra kifejtett hatásait tanulmányoztuk. A vizsgálatokhoz 25%-os és 45%-os etanos kivonatot készítettünk a növényből. Mindkét extraktum jelentős gátló hatást mutatott hERG ioncsatornán, IC<sub>50</sub> értékeiket 8,31 ± 0,79 µg/ml-nek és 5,09 ± 0,49 µg/ml-nek határoztuk meg. A növény fő alkaloidjainak (szangvinarin, kelidonin, berberin és koptizin) hERG gátló hatását szintén vizsgáltuk, és kimutattuk, hogy a koptizin kivételével az összes alkaloid jelentős gátló hatással bír. A szangvinarin és a kelidonin rendelkezik a legerősebb gátló hatással (IC<sub>50</sub> = 0,88 ± 0,08 µM és 1,00 ± 0,10 µM). A berberin IC<sub>50</sub> értéke 6,46 ± 0,54 µM volt, a koptizin pedig csak elenyésző hatással rendelkezik (IC<sub>50</sub> = 90,08 ± 2,88 µM). A hERG gátló hatás biztonságfarmakológiai következményeinek tanulmányozásához a *C. majus* kivonatainak és alkaloidjainak hatását – a koptizin kivételével – akciós potenciálon is megvizsgáltuk kutya jobb kamrai preparátumon. Mindkét kivonat mérsékelten, de statisztikailag szignifikánsan nyújtotta az akciós potenciált 5 µg/ml koncentrációban 1000 ms-os ciklushossz mellett. Az APD<sub>90</sub> nyújtás 10,5%-os volt a 25%-os etanos kivonat esetében, míg a 45%-os etanos kivonat 6,7%-kal nyújtott. A berberin, a kelidonin és a szangvinarin akciós potenciál paraméterekre gyakorolt hatását szintén vizsgáltuk 1 és 10 µM-os koncentrációban. Az anyagoknak csekély, de szignifikáns hatásuk volt az APD<sub>90</sub>-re 1 µM-os koncentrációban (4,6%, 6,1% és 6,3%-kal nyújtottak). 10 µM koncentrációban a nyújtás sokkal jelentősebb volt (18,4%, 18,3% és 16,0%).

## 4. MEGBESZÉLÉS

Az ioncsatornák aktivitásának mérése Erwin Neher és Bert Sakmann úttörő munkájának köszönhetően az 1970-es évek végétől vált lehetségessé. Kifejlesztését követően a manuális patch-clamp módszer a 'gold standard' eljárás lett az ioncsatorna vizsgálatokban. A patch-clamp közvetlen, információgazdag és valós idejű technológia, azonban a hagyományos manuális patch-clamp túl lassú, technikailag nehéz és munkaigényes, amely kizárja ezt a szűrővizsgálatot a gyógyszerfejlesztés és optimalizálás korai szakaszából. Ez azonban nem jelenti azt, hogy a konvencionális patch-clamp elavult. A módszert a gyógyszerkutatófejlesztés késői fázisaiban használják, az alaputatásban pedig még mindig a leggyakrabban

alkalmazott technikák egyike. A patch-clamp ipari alkalmazása azonban a gyógyszerkutatás és az ioncsatorna vizsgálatok legvégső szakaszára korlátozódik.

Az elmúlt években számos cég fejlesztett és vezetett be a piacon automatizált patch-clamp berendezéseket, melyek alkalmasak a gyors és kiváló minőségű szűrésre valamint a gyógyszerjelölt molekulák optimalizálására. A mérések párhuzamos végrehajtása nagyobb áteresztőképességet biztosít a vegyületek és az ioncsatornák tanulmányozása során. Ezek a készülékek képesek áthidalni az elsődleges és másodlagos ioncsatorna szűrés közti szakadékokat azáltal, hogy magas minőségű, információgazdag vizsgálatokat tesznek lehetővé.

Az automata patch-clamp és az ioncsatornák expresszálo rekombináns sejt vonalak alkalmazása leginkább a gyógyszeriparban terjedt el, míg az alap kutatásban inkább a natív sejtekben lévő endogén ioncsatornák tanulmányozása a jellemző. Bár az automatizált patch-clamp rendszerek főleg rekombináns sejt vonalak vizsgálatára alkalmasak, megállapítottuk, hogy a Patchliner képes kiváló minőségű mérésekre egyes natív sejtek és primer kultúrák esetén is. A feszültségfüggő Kv1.3 K<sup>+</sup> csatornák vizsgálatát és karakterizálását natív aktivált humán limfocitákon hajtottuk végre, és a Patchliner alkalmasnak bizonyult a natív limfociták, vagy akár más primer sejtek szűrésére is elfogadható sikerarányal.

Mindazonáltal az automatizált patch-clamp készülékek elsősorban ioncsatornák stabilan expresszálo sejt vonalakat használnak, ahol a sejt szuszpenzió minősége alapvető az elfogadható sikerarány érdekében. A sejtek véletlenszerű kiválasztása miatt lényeges az ioncsatornák homogén kifejezése és a sejtek jó minősége. Ez a random megközelítés a fő oka annak, hogy a legtöbb platform nem használható jól primer vagy tranziensen transzfektált sejtek tanulmányozására.

A gén-központú megközelítésnek, amikor a célfehérje rekombináns emlős sejt vonalakban expresszáloódik, számos előnye van. Ezeket a sejt vonalakat könnyű tenyésztetni, és elég ellenállóak az automata rendszerekben történő méréshez. A célfehérje túltermeltetése megnöveli az áram nagyságát, és javítja a jel-zaj arányt. A nulla vagy nagyon alacsony konduktanciával rendelkező sejtek nagyon érzékeny méréseket tesznek lehetővé, valamint biztosítják a megfigyelt jel háttérében lévő gén(ek) molekuláris szintű azonosíthatóságát. A nem-natív sejt vonalak legfőbb hátránya, hogy a sejt nem a fiziológias target, ezért a válaszok eltérhetnek azoktól, melyek *in vivo* körülmények között következnek be.

Munkánk során GABA, HCN, GIRK, Kv1.4 és hERG csatornákat stabilan expresszálo sejt vonalakat tanulmányoztunk és karakterizáltunk. A GABA<sub>A</sub> klorid csatorna fontos terápiás targetje a szorongásra ható, az alvási folyamatokat befolyásoló, és az epilepszia kezelésére alkalmas gyógyszereknek. A GABA<sub>A</sub> ligand-vezérelt csatornák vizsgálatát a gyors oldatcsere

érdekében az oldatok halmozott (stacked) ráadásával végeztük Patchlinerrel, HEK-sejtekben. Így a receptor deszenzitizációt minimalizálni lehet, és az együttesen alkalmazott gyógyszerek hatásai vizsgálhatók. Az oldatok halmozott (stacked) ráadása, mely lehetővé teszi az anyagok gyors, rövid ideig tartó alkalmazását, megfelelő módszer nemcsak a GABA<sub>A</sub>-receptor, de a legtöbb ligand-vezérelt ioncsatorna tanulmányozására is.

A feszültség-vezérelt HCN ioncsatorna a molekuláris alapját képezi a pacemaker (I<sub>f</sub>) áramnak a szívben. HCN1 és HCN4 sejt vonalakat vizsgáltunk Patchlinerrel, a leginkább specifikus és szelektív gátlószer, az ivabradin alkalmazásával. Az ivabradin mindkét áramot gátolta, az izolált miocitákból származó irodalmi adatokkal közel azonos mértékben.

A GIRK1/4 csatornák szelektíven expresszálódnak a pitvarban és nincsenek jelen a kamraizomzatban. Szelektív gátlásuk alkalmas lehet a pitvarfibrilláció kezelésére, súlyos kamrai mellékhatások nélkül. A sejt vonal karakterizálása után előválogatott kémiai könyvtárak, valamint természetes forrásból származó molekulák és kivonatok szűrését hajtottuk végre a sejt vonalon.

A kémiai könyvtárak szűrése során 4 ígéretes vegyületet találtunk, melyek dózis-hatás görbéi és IC<sub>50</sub> értékei részletes kísérletekben kerültek meghatározásra GIRK és hERG csatornán. A Ryt-243 hasonló gátló hatást mutatott mindkét csatornán, a másik 3 anyag (Ryt-143, Ryt-144 és Ryt-230) legalább tízszeres aktivitást mutatott GIRK csatornán, mint hERG csatornán. A Ryt-243-at további vizsgálatoknak vetettük alá. A hERG gátló hatás ellenére a vegyület nem nyújtotta az akciós potenciált nyúl kamrai preparátumon. A jelenség lehetséges magyarázata az, hogy szer egyéb ioncsatorná(ka)t is gátol az akciós potenciál repolarizációs fázisában. A Ryt-243-at megvizsgáltuk kutya modellben is. A vegyület erős antiaritmiás hatást mutatott. Az antiaritmiás eredmények alapján szabadalmi kérvényt nyújtottunk be a pitvarfibrilláció kezelésére alkalmas, Ryt-243 hatóanyagú gyógyszerkészítményre vonatkozóan. A GIRK szelektivitással rendelkező anyagokat (Ryt-143, Ryt-144 és Ryt-230) további, jelenleg is zajló antiaritmiás valamint szerkezet-hatás vizsgálatoknak vetettük alá.

Természetes forrásból származó vegyületeket szintén vizsgáltunk a GIRK szűrés projekt során. Az anyagokat véletlenszerűen jelöltünk ki és nem voltak előválogatva. Az eredmények azt mutatják, hogy természetes anyagok szűrésekor magas találati aránnyal számolhatunk. A biológiailag aktív vegyületek hatáskövetéssel történő azonosítására új módszert dolgoztunk ki: *Polygonum persicaria* kivonatokat szűrtünk GIRK csatornán azzal a céllal, hogy azonosítsunk természetes eredetű ígéretes ioncsatorna blokkoló vegyületeket. Ismereteink szerint mi alkalmaztunk először ilyen típusú vizsgálatokat növényi kivonatok szűrésére. A vizsgálat során a *Polygonum persicaria* kloroformos kivonatának GIRK gátló hatását

kimutattuk, és új természetes flavonoidokat azonosítottunk az extraktumból. Az izolált vegyületek csak mérsékelt aktivitást mutattak GIRK csatornán, ezért további vizsgálatok szükségesek a hatásért felelős aktív molekulák azonosítása céljából.

A Kv1.4 csatornának fontos szerepe van az akciós potenciál gyors repolarizációs fázisának szabályozásában, így befolyásolja a szív akciós potenciál időtartamát. Erre a sejtvonalra nagy, nanoamperes nagyságrendű áramok voltak jellemzőek. Mindkét tesztelt referencia anyag (chromanol 293B, 4-aminopiridin) blokkolta az áramot, összhangban a miocitákon mért irodalmi adatokkal. Több természetes növényi eredetű molekulát vizsgáltunk meg ezen a csatornán, melyeknek a GIRK szelektivitását tanulmányoztuk.

Az ioncsatornákra ható új és hatékony gyógyszerek felfedezése és fejlesztése mellett másik fontos területe az automatizált patch-clamp rendszerek alkalmazásának a biztonságfarmakológia. A gyógyszerek által okozott életveszélyes aritmiák és hirtelen szívhalál az egyik legfontosabb biztonságfarmakológiai probléma a gyógyszeripar és a hatóságok számára. Ez a proaritmiás hatás a gyors késői egyenirányító  $K^+$  áram ( $I_{Kr}$ ) gátlásának tulajdonítható. Ezért az új szerek biztonságfarmakológiai profiljának felállításában nélkülözhetetlen azok  $I_{Kr}$  áramra és akciós potenciálra gyakorolt hatásának vizsgálata. Ezek a tesztek azonban bonyolultak és időigényesek, ezért a szívizomsejteken végzett  $I_{Kr}$  méréseket felváltotta annak rekombináns megfelelője, a hERG vizsgálat. A hERG analízis egy nagy hatékonyságú és nagy áteresztőképességű módszer, de néha hamis pozitív és negatív eredményeket adhat, melyek mechanizmusa nem teljesen tisztázott. Ezért összehasonlítottuk a dofetilid és a szotalol hERG (szobahőmérsékleten és 37°C-on) és  $I_{Kr}$  (37°C-on) áramokra kifejtett hatását, hogy tanulmányozzuk a hERG mérések használhatóságát vegyületek proaritmiás kockázatainak felmérésében, és jobban megértsük a proaritmiás biztonságfarmakológiai vizsgálatok mechanizmusát. A dofetilid hatása hasonló volt szobahőmérsékleten és fiziológiás hőmérsékleten hERG csatornán, továbbá ezek az adatok jó egyezést mutattak az akciós potenciál méréseinkkel is. Ezzel ellentétben a szotalol hatása eltérő volt szobahőmérsékleten és 37°C-on, ezért a biztonságfarmakológiai vizsgálatokban különösen fontos, hogy az anyagokat fiziológiás hőmérsékleten teszteljük, és a Patchliner ideális eszköz lehet az ilyen típusú kísérletek végrehajtására. Mindazonáltal, a szotalol esetében jelentős különbség volt megfigyelhető a hERG és az  $I_{Kr}$   $IC_{50}$  értékek között is.

Kísérleteink alapján az automata patch-clamp készülékkel HEK-hERG sejtvonalon mért adatok általában elfogadható összhangban vannak az  $I_{Kr}$  mérésekkel. Ugyanakkor léteznek fontos és nem teljesen értett különbségek az automata patch-clamp vizsgálatok és az egyéb technikák, mint például az  $I_{Kr}$  vagy az akciós potenciál kísérletek között. Általában a

kitapadást és a csapadékképződést tartják a kevésbé pontos, jobbra tolódott dózis-hatás görbék fő forrásának. Azonban a szotalol a legkevésbé hidrofób vegyületek közé tartozik, ráadásul számos olyan tanulmányban is rendkívül magas  $IC_{50}$  értékekről számoltak be, ahol a szotalol hatását hERG sejtvonalon, de manuális patch-clamp módszerrel vizsgálták. Egyre több bizonyíték jelzi, hogy a natív  $I_{Kr}$  csatornák felépítése nagyon komplex, és az  $\alpha$ -alegység összetétele befolyásolja a csatorna érzékenységét. A legtöbb hERG vizsgálatban olyan rekombináns sejtvonalakat alkalmaznak, melyek csak a hERG 1a alegységet expresszálnak, habár a natív kamrai  $I_{Kr}$  csatornák heteromerek, melyek egyaránt tartalmaznak hERG 1a és 1b alegységeket. A legtöbb anyag (köztük a szotalol) hatását hasonlóan írták le a két targeten, néhány esetben azonban különbség volt megfigyelhető. Így a leggyakrabban használt hERG 1a vizsgálatok alá- vagy fölébecsülhetik bizonyos szerek kockázatait. Ezen túlmenően, egyéb tanulmányokban azonosítottak a hERG hatóanyag-érzékenységét befolyásoló, azzal kölcsönható fehérjéket is. Például a MinK, a MiRP1 és a KCR1 olyan stabil komplexet alkotnak a pórusképző alegységgel, melynek a funkcionális tulajdonságai hasonlítanak a natív csatornáéhoz, magasabb szintre emelve a szív elektrofiziológiáját befolyásoló szabályozó mechanizmusokat. Mivel a hERG vizsgálatok eredményei nem annyira kielégítőek, mint azt korábban feltételezték, az ezzel kapott proaritmiás eredményeket érdemes elővigyázatossággal kezelni.

Ezen tapasztalatok alapján végeztük el a *Chelidonium majus* biztonságfarmakológiai vizsgálatát, melyben a növény kivonatainak és alkaloidjainak hERG  $K^+$  csatornára és kamrai akciós potenciálra kifejtett hatásait is tanulmányoztuk. A vizsgálatokban a *C. majus* alkoholos kivonatait és alkaloidjait teszteltük, melyek nem csak gátolták a hERG áramot, de nyújtották az akciós potenciált is. Bizonyos körélettani körülmények között, ahol a repolarizációs tartalék csökkent, ezek a kivonatok és alkaloidok tovább növelhetik a proaritmiás kockázatot és a hirtelen szívhalál lehetőségét. Eredményeink alapján fenntartásokat fogalmazhatunk meg a *C. majus* használatával kapcsolatosan, a vérehulló fecskefű készítmények orális alkalmazása elővigyázatosságot igényel a potenciális kardiovaszkuláris mellékhatások miatt.

## 5. KONKLÚZIÓ

1. A teljesen automatizált Patchliner patch-clamp berendezés kiváló adatminőséget és megbízható méréseket tesz lehetővé. A berendezés kompatibilis a legtöbb sejtvonallal, és az eredmények jó összhangban vannak a manuális patch-clamp vizsgálatokkal. A fokozott áteresztőképesség és magas sikerarány miatt a Patchliner kiváló eszköznek

bizonyult celluláris elektrofiziológiai kísérletek végrehajtására, használatát határozottan javasoljuk mind az alapkutatóknak, mind a gyógyszeripar számára.

2. A készülékkel számos sejt vonalat karakterizáltunk és használtunk előválogatott kémiai könyvtárak szűrésére. A szűrési eredmények alapján szabadalmi kérvényt nyújtottunk be a pitvarfibrilláció kezelésére alkalmas, Ryt-243 hatóanyagú gyógyszerkészítményre vonatkozóan.
3. Természetes (növényi) forrásból származó vegyületeket szintén vizsgáltunk a GIRK szűrési projekt során. Az eredményeink alapján a természetes forrásból származó molekulákra kimagasló találati arány jellemző.
4. Ismereteink szerint mi vizsgáltuk először növényi kivonatok hatását GIRK csatornán azzal a céllal, hogy azonosítsunk természetes eredetű ígéretes ioncsatorna blokkoló vegyületeket.
5. A biztonságfarmakológiai vizsgálatokban kimutattunk fontos és nehezen értelmezhető különbségeket az automata patch-clamp módszerrel végrehajtott hERG mérések és az egyéb technikák, mint például a manuális patch-clamp eljárással végzett  $I_{Kr}$  mérések vagy az akciós potenciál kísérletek között. Megállapítottuk, hogy a korábbi feltételezésekkel ellentétben a hERG vizsgálatok nem mindig kielégítőek és elégségesek a proaritmiás kockázat megítéléséhez, a módszerrel kapott eredményeket érdemes elővigyázatossággal kezelni.
6. A *Chelidonium majus* gyógynövényen végzett elektrofiziológiai vizsgálatokban megállapítottuk, hogy a növény kivonatai és alkaloidjai gátolták a hERG csatornát és nyújtják az akciós potenciált. Eredményeink hozzájárultak a növény toxikus hatásainak megértéséhez, és rávilágítanak a gyógynövény alkalmazásának lehetséges kockázataira.

## 6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt hálás köszönetemet szeretném kifejezni néhai **Prof. Dr. Vas Ádámnak**, aki minden erejével támogatta munkámat, és aki nélkül a disszertáció elkészítése nem lett volna lehetséges.

Legmélyebb hálámat szeretném kifejezni **Prof. Dr. Varró Andrásnak**, aki irányított, támogatott engem, és folyamatosan segített tanácsaival. Különösen hálás vagyok **Prof. Dr. Hohmann Juditnak** az értékes tanácsaiért és a kísérletes munkám folyamatos támogatásáért. Szeretném megköszönni témavezetőmnek, **Dr. Virág Lászlónak**, hogy a Ph.D. tanulmányaim

kezdetétől fogva tanácsaival és technikai segítségével támogatta munkámat. Hálámat szeretném kifejezni **Dr. Tálosi Lászlónak** a támogatásáért, és azért, hogy biztosította a munkához szükséges technikai háttérrel és berendezéseket számomra.

Szintén hálás vagyok **Molnár Imrénének**, **Kohajda Zsófiának** és **Amir Geramipournak** a kísérletes munkában való segítségért és a technikai támogatásért. Köszönetemet szeretném kifejezni publikációim összes társszerzőjének az értékes együttműködésért.

Szintén köszönöm a **Richter Gedeon Talentum Alapítvány** pénzügyi támogatását, és a **Nanion Technologies** folyamatos technikai segítségét.

## A DISSZERTÁCIÓ TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

- I. Effects of Chelidonium majus extracts and major alkaloids on hERG potassium channels and on dog cardiac action potential - a safety approach.** Orvos P, Virág L, Tálosi L, Hajdú Z, Csupor D, Jedlinszki N, Szél T, Varró A, Hohmann J. *Fitoterapia*. 2015 Jan; 100:156-65.  
IF: 2.345 [2014]
- II. Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels by extracts of Polygonum persicaria and isolation of new flavonoids from the chloroform extract of the herb.** Lajter I, Vasas A, Orvos P, Bánsághi S, Tálosi L, Jakab G, Béni Z, Háda V, Forgo P, Hohmann J. *Planta Med*. 2013 Dec; 79(18):1736-41.  
IF: 2.339
- III. Identification of diterpene alkaloids from Aconitum napellus subsp. firmum and GIRK channel activities of some Aconitum alkaloids.** Kiss T, Orvos P, Bánsághi S, Forgo P, Jedlinszki N, Tálosi L, Hohmann J, Csupor D. *Fitoterapia*. 2013 Oct; 90:85-93.  
IF: 2.216

## EGYÉB PUBLIKÁCIÓK

- I. Electrophysiological effects of ivabradine in dog and human cardiac preparations: potential antiarrhythmic actions.** Koncz I, Szél T, Bitay M, Cerbai E, Jaeger K, Fülöp F, Jost N, Virág L, Orvos P, Tálosi L, Kristóf A, Baczkó I, Papp JG, Varró A. *Eur J Pharmacol*. 2011 Oct 15; 668(3):419-26.  
IF: 2.516





### TÁRSSZERZŐI NYILATKOZAT

Alulírott Prof. Dr. Hohmann Judit, mint az alábbi közlemények felelős szerzője, hozzájárulok, hogy Orvos Péter doktorjelölt a „Role of automated patch-clamp systems in drug research and development” című Ph.D. értekezéséhez, mint saját tudományos tevékenység felhasználja az alábbi publikációkat:

Kiss Tivadar, Orvos Péter, Bánsághi Száva, Forgo Peter, Jedlinszki Nikoletta, Tálosi László, Hohmann Judit, Csupor Dezső

Identification of diterpene alkaloids from *Aconitum napellus* subsp. *firmum* and GIRK channel activities of some *Aconitum* alkaloids

FITOTERAPIA 90: pp. 85-93. (2013)

IF: 2.216

Lajter Ildikó, Vasas Andrea, Orvos Péter, Bánsághi Száva, Tálosi László, Jakab Gusztáv, Béni Zoltán, Háda Viktor, Forgo Peter, Hohmann Judit

Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels by extracts of *Polygonum persicaria* and isolation of new flavonoids from the chloroform extract of the herb

PLANTA MEDICA: NATURAL PRODUCTS AND MEDICINAL PLANT RESEARCH 79:(18) pp. 1736-1741. (2013)

IF: 2.339

A felsorolt publikációkban Orvos Péter doktorjelölt végezte a növényi kivonatok és vegyületek elektrofiziológiai vizsgálatát Nanion Patchliner automata patch-clamp berendezéssel génexpressziós rendszereken (HEK-GIRK és HEK-hERG sejtvonalon). A sejtvonalak kezelése, fenntartása, a mérések beállítása, azok végrehajtása és az eredmények kiértékelése teljes egészében a jelölt saját munkái. A közlemény ezen részeit nem kívánjuk felhasználni más Ph.D. értekezéshez.

Szeged, 2016. március 18.

  
.....  
Prof. Dr. Hohmann Judit  
tanszékvezető egyetemi tanár  
nevezett publikációk felelős szerzője

