

**A C-TÍPUSÚ NÁTRIURETIKUS PEPTID RELAXÁLÓ  
HATÁSA IZOLÁLT ARTÉRIÁKON; EGY MODELL  
HIPERPOLARIZÁLÓ ÉRTÁGÍTÓK FEJLESZTÉSÉHEZ**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Márton Zoltán MPharm**

Szegedi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

A keringési rendszer élet- és kórtana, farmakológiája doktori program

Témavezető:

**Dr. Pataricza János**

SZTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Szeged

2009



**A C-TÍPUSÚ NÁTRIURETIKUS PEPTID RELAXÁLÓ  
HATÁSA IZOLÁLT ARTÉRIÁKON; EGY MODELL  
HIPERPOLARIZÁLÓ ÉRTÁGÍTÓK FEJLESZTÉSÉHEZ**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Márton Zoltán MPharm**

Szegedi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

A keringési rendszer élet- és kórtana, farmakológiája doktori program

Témavezető:

**Dr. Pataricza János**

SZTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Szeged

2009

Kapcsolódó cikkek:

I. **Márton Z.**, Pataricza J., Krassói I., Varró A., Papp J.Gy.  
NEP inhibitors enhance C-type natriuretic peptide-induced relaxation in porcine isolated coronary artery.  
*Vascular Pharmacol* 43: 207-212, 2005. **IF (2005)**  
**= 1.200**

II. **Márton Z.**  
Inodilátorok és a C-típusú nátriuretikus peptid értágító hatásának mechanizmusa sertésszívből izolált koszorúéren.  
*Cardiol. Hung.* 36: 159-165, 2006. **IF (2005)**  
**= 0**

III. Kun A., Király I., Pataricza J., **Márton Z.**, Krassói I., Varró A., Simonsen U., Papp J.Gy., Pajor L.  
C-type natriuretic peptide hyperpolarizes and relaxes human penile resistance arteries.  
*J. Sexual Med.* 5: 1114-1125, 2008. **IF (2007)**  
**= 6.199**

További cikkek:

IV. Pataricza J., **Márton Z.**, Lengyel Cs., Tóth M., Papp J.Gy., Varró A., Kun A.  
Potassium channels sensitive to combination of charybdotoxin and apamin regulate the tone of diabetic isolated canine coronary arteries.  
*Acta Physiologica (Scand.)* 194: 35-43, 2008. **IF (2007)**  
**=1.602**

V. Pataricza J., Krassói I., Bitay M., **Márton Z.**, Varró A., Papp J.Gy.  
Inter-species differences and extracellular calcium dependence in the vasorelaxing effect of cromakalim in isolated human, porcine and canine coronary arteries.  
*Vascular Pharmacology.* (Manuscript No. VPH-D-07-00008) Submitte

1. BEVEZETÉS .....	1
1.1. AZ ENDOGÉN C–TÍPUSÚ NÁTRIURETIKUS PEPTID SZEREPE A HOMEOSZTÁZIS SZABÁLYOZÁSÁBAN.....	1
1.2. A CNP EFFEKTOR RENDSZEREI .....	2
1.3. K <sup>+</sup> CSATORNÁK ÉS ALTÍPUSAIK .....	2
1.4. A CNP ELIMINÁCIÓJA.....	4
2. CÉLKITŰZÉS.....	4
3. EREDMÉNYEK.....	6
3.1. KONDUKTANCIA TÍPUSÚ EREK .....	6
3.1.1. A CNP vazorelaxáns hatása patkány izolált artériákon .....	6
3.1.2. A CNP hatásának vizsgálata sertésszív izolált koszorúéren .....	6
3.1.2.1. Az endotélfunkció meghatározása sertés koszorúéren.....	6
3.1.2.2. A C-típusú nátriuretikus peptid vazorelaxáns hatása sertés koszorúéren.....	7
3.1.2.2.1. Foszforamidon hatása a CNP indukálta vazorelaxációra.....	7
3.1.2.2.2. Tiorfán hatása a CNP indukálta vazorelaxációra.....	7
3.1.2.2.3. Az endotelin receptor gátlás hatása a CNP indukálta koszorúér relaxációra.....	8
3.1.2.3. A CNP hiperpolarizáló hatása sertés koszorúéren .....	8
3.1.2.4. A CNP vazorelaxáns és hiperpolarizáló hatásának összevetése .....	9
3.1.3. Az OR-2828 hatásának vizsgálata.....	9
3.1.3.1. Az OR-2828 hatása sertés koszorúér izometriás tónusára.....	9
3.1.3.2. Az OR-2828 membránpotenciálra gyakorolt hatásának összevetése a CNP-vel és a levosimendánnal sertés koszorúér simaizomszövetén.....	9
3.1.3.3. Korreláció az OR-2828 hiperpolarizáló és relaxáló hatása között.....	10
3.1.3.4. Az OR-2828 eltérő dózisa által létrehozott relaxáció és hiperpolarizáció összehasonlítása .....	10
3.1.3.5. A feszültségfüggő kálium csatorna blokkoló 4-aminopiridin hatása az OR-2828 indukálta relaxációra .....	11
3.2. REZISZTENCIA TÍPUSÚ ÉR – HUMÁN PÉNISZ ARTÉRIA.....	11
3.2.1. A CNP vazorelaxáns hatása humán pénisz artériákon.....	11
3.2.2. A CNP hiperpolarizáló hatása izolált humán pénisz artériákon.....	11
3.2.3. A BK <sub>Ca</sub> csatornák szerepének vizsgálata a CNP indukálta relaxációban .....	12
4. ÖSSZEFOGLALÁS .....	12
4.1. KONDUKTANCIA TÍPUSÚ EREK .....	12
4.2. REZISZTENCIA TÍPUSÚ EREK.....	14
5. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	15

## **1. BEVEZETÉS**

### **1.1. Az endogén C-típusú nátriuretikus peptid szerepe a homeosztázis szabályozásában**

Az endogén C-típusú nátriuretikus peptid (CNP) értónus regulátor tulajdonsága révén fontos szerepet játszik a keringésszabályozásban. A CNP a nátriuretikus peptidek (NP) családjába tartozik. A család további tagjai a pitvari nátriuretikus peptid (atrial natriuretic peptide (ANP)), az agyi nátriuretikus peptid (brain natriuretic peptide (BNP)), az urodilatin és a “dendroapsis” nátriuretikus peptid (dendroapsis natriuretic peptide (DNP)). A nátriuretikus peptideket és receptoraikat sokféle gerinces fajban kimutatták a porcoshalaktól az emlősökig. Ezen mediátorok az alacsonyabbrendű fajokban hatnak kifejezettebben a  $\text{Na}^+$  anyagcserére, az emlősökben a fiziológias folyadék homeosztázis és vérnyomás fenntartásában van kulcsfontosságú szerepük. A CNP-t először - 1990-ben - Sudoh és munkatársai izolálták sertés agyszövet kivonatból. A peptidlánc 22 aminosavas reziduumokat tartalmaz, és szekvenciahomológiát mutat az ANP-vel és BNP-vel egy diszulfid híd által létrehozott peptidláncon belüli gyűrű tekintetében. A szerkezeti hasonlóság ellenére a parakrin, helyi szabályozó szerepet betöltő CNP mind genetikailag, mind funkcionálisan különbözik a szisztémás hatású ANP-től és BNP-től. Elmondható még a C-típusú nátriuretikus peptidről, hogy nevével ellentétben nincs jelentős hatása a vese folyadék- és elektrolitkiválasztására.

A CNP megtalálható a központi idegrendszerben és a vesében, ezenkívül fontos szabályozója a porc képzésnek és csontosodásnak. Az erek endotéliumában konstitutív módon képződik. Bár a CNP-t neuromodulátorként fedezték fel, hamarosan a peptid vaszkuláris hatásai kerültek előtérbe:

1/ hatékony simaizom-relaxáns és 2/ potens antiproliferatív és antimigrációs tulajdonsága van az erek simaizmain.

## **1.2. A CNP effektor rendszerei**

A CNP biológiai hatását a sejtfelszínen található NP receptorokhoz való kötődés révén fejt ki, melyek közül a B (NPR-B) és C (NPR-C) típusúakat különböztetik meg.

Az NPR-B receptor a hozzákapcsolódó partikuláris guanilil-cikláz aktiválódása révén emeli az intracelluláris cGMP szintet, ezzel a simaizomsejt relaxációját eredményezi.

Az NPR-B-vel ellentétben az NPR-C-hez nem kapcsolódik guanilil-cikláz enzim, így nincs közvetlen hatása a sejt cGMP szintjére.

A CNP indukálta vazorelaxáció kialakulásában a cGMP-függő ioncsatornák szerepe jelenleg még nem teljesen tisztázott. Feltételezik, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -aktiválta  $\text{K}^+$  csatornák ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ) működését befolyásolják, ami a simaizom membránjának hiperpolarizációját eredményezi.

## **1.3. $\text{K}^+$ csatornák és altípusaik**

A  $\text{K}^+$  csatornák működése a sejt membránpotenciáljának alapvető meghatározója, így az értónus szabályozásában is részt vesznek. Az endotélfüggő értágítók, azaz a nitrogén-monoxid (NO), prosztaciklin és az endotélium-függő hiperpolarizáló faktor (EDHF) aktiválhatják a sejt membránjában található  $\text{K}^+$  csatornákat, így lehetővé válik a  $\text{K}^+$  ionok sejtből történő kiáramlása. Ez az ionáram növeli a membránpotenciált, és a következményes hiperpolarizáció zárja a feszültség-függő  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornákat a sejtmembránban, ami relaxációt eredményez az ér simaizmán.

A kinetikai tulajdonságok, reguláció, farmakológiai sajátosságok és felépítés tekintetében a  $K^+$  csatornák az ioncsatornák közül a legtöbb ismert altípussal rendelkeznek. Az endotélsejtek és az erek simaizomsejtjei négyféle eltérő  $K^+$  ioncsatornát tartalmaznak: 1) feszültség-függő  $K^+$  csatornákat ( $K_v$ ); 2)  $Ca^{2+}$ -aktiválta  $K^+$  csatornákat ( $K_{Ca}$ ), ideértve a nagy ( $BK_{Ca}$ ), közepes ( $IK_{Ca}$ ) és kis konduktanciájú ( $SK_{Ca}$ ) altípusokat; 3) ATP-szenzitív  $K^+$  csatornákat ( $K_{ATP}$ ); valamint 4) befelé egyenirányító (“inwardly rectifying”)  $K^+$  csatornákat ( $K_{ir}$ ).

A  $K^+$  csatornák három alcsaládba sorolhatók: a 2 transzmembrán fehérjével rendelkezők (2TM) alcsaládjába, a 4TM és a 6TM alcsaládokba. A  $K^+$  csatornák minden alcsaládjába tartalmaz egy központi csatornaképző  $\alpha$  alegységet, melyhez többféle regulációs alegység csatlakozhat. A 2TM és 4TM alcsaládba tartozó  $K^+$  csatornák tárgyalása nem témája a jelen értekezésnek.

A 6TM alcsaládba tartoznak a feszültség-függő  $K^+$  csatornák ( $K_v$ ), a KCNQ csatornák, az EAG csatornák (ezen belül a HERG is) valamint a kalcium-aktiválta  $K^+$  csatornák ( $BK_{Ca}$ ,  $SK_{Ca}$ ).

Az  $\alpha$  alegységbeli különbségek alapján a  $K_v$  csatornákat a következő csoportokra oszthatjuk:  $K_v 1.x$  (Shaker),  $K_v 2.x$  (Shab),  $K_v 3.x$  (Shaw) és  $K_v 4.x$  (Shal); Shaker és Shab típusú csatornákat mutattak ki simaizomban és mezenteriális artériákban. Ezek a csatornák érzékenyek a 4-aminopyridin (4-AP) nevű blokkolószerre.

A KCNQ1-5 (azaz a  $K_v 7.1 - 7.5$ ) csatornáknak jelentős szerepük van a szívben az akciós potenciál repolarizációs fázisának kialakításában, de a vesében, agyban és tüdőben is kimutatták őket.

További, potenciálisan 4-AP érzékeny feszültségfüggő csatornák az EAG ( $K_v 10.x$ ,  $K_v 11.x$ ,  $K_v 12.x$ ) csatornák, melyek fontos szerepet töltenek be a szív repolarizációjában.



Szerkezeti felépítés szempontjából a  $\text{Ca}^{2+}$ -aktiválta  $\text{K}^+$  csatornákat két csoportra oszthatjuk: a kicsi vagy közepes konduktanciájú  $\text{K}^+$  csatornákra ( $\text{SK}_{\text{Ca}}$  / $\text{IK}_{\text{Ca}}$ ) és a nagy konduktanciájú  $\text{K}^+$  csatornákra ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$  vagy Maxi-K). Ezen csatornák nyitási valószínűsége nő az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -szint emelkedésével, ami a sejtmembrán hiperpolarizációjához vezet. A  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  csatornák egy csatornaképző  $\alpha$  alegységből és egy regulátoros  $\beta$  alegységből állnak, és meghatározói a simaizom sejt kontrakció regulációjának. A hiperpolarizáció kialakulásáért felelős  $\text{SK}_{\text{Ca}}$  és  $\text{IK}_{\text{Ca}}$  csatornákat is kimutatták a simaizomban és az endotél sejtekben.

#### **1.4. A CNP eliminációja**

A CNP eliminációjában részt vesznek a korábban említett NPR-C receptorok is, melyek internalizálják a peptidet. Egy másik, igen jelentős eliminációs út, az enzimatis bomlás is ismert. A CNP enzimatis lebontásában a neutrális endopeptidáznak (EC. 3.4.24.11, NEP) van a legfontosabb szerepe. A NEP egy membránhoz kötött cink tartalmú metalloproteáz, mely sokféle vazóaktív peptidet bont, melyek értónusra gyakorolt hatása is eltérő. Néhány ezen peptidek közül értágító tulajdonságú, mint pl. az ANP, bradikinin vagy P-anyag, míg mások érszűkítők, mint az endotelin.

## **2. CÉLKITŰZÉS**

A dolgozat fő célja a CNP vazorelaxáns hatásának vizsgálata patkányból izolált szisztémás artériákon, sertés szív koszorúerén és rezisztencia típusú humán pénisz artérián. Az endotélium vazorelaxációban betöltött lehetséges szerepét és a peptid egyik eliminációs útját farmakológiai gátlószerek

segítségével vizsgáltuk. A CNP és további két vegyület esetében a vazorelaxáns hatás háttérében feltételezhető simaizom hiperpolarizáció kialakulását vizsgáltuk izolált sertés szív koszorúéren. A hiperpolarizációt létrehozó  $K_v$  és  $BK_{Ca}$  csatornákat sertésszívből izolált koszorúéren és humán péniszből izolált artérián vizsgáltuk.

Vizsgálataink középpontjában az alábbi célkitűzések álltak:

1/ A CNP hatékonyságának meghatározása patkány carotis, mesenterialis és femorális artériákon *in vitro*.

2/ Az ér endotélium lehetséges szerepének vizsgálata a CNP indukálta vazorelaxáció mechanizmusában sertésszívből izolált koszorúéren. Az endotelin inhibitor PD142893 hatásának vizsgálata.

3/ A CNP eliminációjában fontos szerepet játszó NEP szerepének vizsgálata sertés szív izolált koszorúerén. A NEP gátló foszforamidon és tiorfán hatása a CNP indukálta vazorelaxációra.

4/ A CNP hiperpolarizáló hatásának vizsgálata és ezen tulajdonságának összehasonlítása a kalcium érzékenyítő levosimendánnal és az új vazodilátorral, az OR-282-cal sertés szív izolált koszorúerén.

5/ Az OR-2828 indukálta vazorelaxáció és hiperpolarizáció közti korreláció vizsgálata sertés szívből izolált koszorúéren. A 4-aminopiridin érzékeny  $K_v$  csatornák szerepe az OR-2828 hatásmechanizmusában.

6/ A CNP endotéliumtól független vazorelaxáns és hiperpolarizáló hatásának vizsgálata rezisztencia típusú humán pénisz artérián *in vitro*. Az eredmények összevetése az endotélfüggő relaxáns acetilkolin hatásával.

7/ A  $BK_{Ca}$  csatornák szerepe a nem nitrogén-monoxid/nem prosztaglandin típusú CNP indukálta vazorelaxációban rezisztencia típusú humán pénisz artérián.

### 3. EREDMÉNYEK

#### 3.1. Konduktancia típusú erek

##### 3.1.1. A CNP vazorelaxáns hatása patkány izolált artériákon

A CNP vazorelaxáns hatását három eltérő artériatípuson – carotis, femorális és mezenteriális artériákon – vizsgáltuk *in vitro* körülmények között. A CNP mindhárom vizsgált értípuson dóziszfüggő relaxációt hozott létre. A fenilefrinnel prekontrahált carotis és mezenteriális artériák tónusát nagyobb hatásossággal csökkentette a CNP, mint a femorális artériákét. A peptid által létrehozott vazorelaxáns hatás maximális, mért értékei a következők voltak: arteria carotis:  $86,4 \pm 2,9\%$  (n=5); arteria mesenterica superior:  $72,6 \pm 4,1\%$  (n=9); arteria femoralis:  $22,1 \pm 4,6\%$  (n=7). A számított  $EC_{50}$  értékek hasonlóak voltak mindhárom ér esetében: arteria carotis:  $7,9 * 10^{-7}$  M; arteria mesenterica superior:  $7,0 * 10^{-7}$  M; arteria femoralis:  $1,8 * 10^{-7}$  M. Az  $y=a*x/(x+b)$  összefüggést alkalmazva kiszámítható volt, hogy  $1 \mu\text{M}$  CNP a maximális mért értékekhez közeli hatást fejt ki, amiből arra következtethetünk, hogy a CNP ezen koncentrációja szubmaximális relaxáció kifejtésére képes a vizsgált értípusokon.

Ezen eredmények alapján a CNP vazorelaxáns hatásának vizsgálatát egy specializált értípuson, sertés szív izolált koszorúerén folytattam.

##### 3.1.2. A CNP hatásának vizsgálata sertésszív izolált koszorúerén

###### 3.1.2.1. Az endotélfunkció meghatározása sertés koszorúerén

Az endotéliumot stimuláló bradikinin és A23187 hatását vizsgáltuk prosztaglandin analóggal prekontrahált sertés koszorúerén. A kísérleteket ép endotél jelenlétében és hiányában is elvégeztük. Az U46619 prosztaglandin analóg hasonló mértékben kontrahálta az intakt endotéllel rendelkező és az endotéltől megfosztott érgyűrűket ( $84,5 \pm 7,2$  mN; n=8 és  $87,6 \pm 16,3$  mN; n=9).

1  $\mu\text{M}$  bradikinin relaxálta az ép endotéllel rendelkező koszorúereket, míg a denudált preparátumokon kontrakciót okozott. A kalcium-ionofór A23187 csökkentette az U46619-cel prekontrahált intakt erek tónusát, míg a deendotelizált preparátumok tónusát nem változtatta meg.

Az endotélfunkció igen sérülékeny, és több független tényező határozza meg, így annak érdekében, hogy összevethető adatokat kapjunk, épségét minden mérés előtt ellenőriztük. Intaktnak abban az esetben fogadtuk el az endotélt, ha a bradikinin adása után relaxáció jött létre.

3.1.2.2. A C-típusú nátriuretikus peptid vazorelaxáns hatása sertés koszorúéren

3.1.2.2.1. Foszforamidon hatása a CNP indukálta vazorelaxációra

A foszforamidon CNP indukálta relaxációra kifejtett hatását endotélium jelenlétében és hiányában is megvizsgáltuk.

Endotélium jelenlétében a CNP koncentráció függően csökkentette a prekontrahált erek tónusát, a mért maximális relaxáció  $36,4 \pm 4,5\%$  ( $n=8$ ) volt. A relaxáció mértékét a foszforamidonnal való előkezelés szignifikánsan növelte, a CNP által kiváltott maximális relaxáció ebben az esetben  $56,2 \pm 6,2\%$  ( $n=8$ ;  $p < 0,05$ ) volt. A számított  $EC_{50}$  értékek ( $0,042 \pm 0,008 \mu\text{M}$  vs.  $0,031 \pm 0,012 \mu\text{M}$ ) nem mutattak szignifikáns eltérést.

Az endotéltől megfosztott érgyűrűk vizsgálata során a CNP relaxáns hatása nem változott, és potencírozható volt foszforamidon előkezeléssel, hasonlóan az ép érgyűrűkön tapasztalt eredményekhez ( $38,3 \pm 4,8\%$  ( $n=8$ ) vs.  $55,4 \pm 5,1\%$  ( $n=8$ ;  $p < 0,05$ )).

3.1.2.2.2. Tiorfán hatása a CNP indukálta vazorelaxációra

Az előző kísérleti sorozathoz hasonlóan a CNP dózisfüggően relaxálta mind az endotéllel rendelkező, mind a deendotelizált érgyűrűket. A relaxáció

maximális mértéke az endotélitől megfosztott éren nem volt szignifikánsan kisebb, mint az endotéllel rendelkező érgyűrűn ( $33,0 \pm 4,7\%$ ;  $n=8$  vs.  $41,4 \pm 5,1\%$ ;  $n=8$ , n.s.). A tiorfán előkezelés mindkét csoportban fokozta a CNP vazorelaxáns hatását, az  $EC_{50}$  megváltoztatása nélkül.

#### 3.1.2.2.3. Az endotelin receptor gátlás hatása a CNP indukálta koszorúér relaxációra

Az endotelin CNP indukálta relaxációra kifejtett hatásának vizsgálata során endotelin antagonistát (PD142893) alkalmaztunk. A koszorúérgyűrűkön U46619-cel indukált kontrakció mértékét nem változtatta meg a PD142893 előkezelés sem endotélium jelenlétében, sem annak hiányában. A PD142893 csak kismértékben növelte a bazális tónust, ami csekély mértékű endotelin felszabadulásra utal ezen az értípuson. Az endotelin antagonista potenciózta a vazorelaxáns hatást ép endotéllel rendelkező éren alacsony CNP koncentráció esetében.

#### 3.1.2.3. A CNP hiperpolarizáló hatása sertés koszorúéren

Vazorelaxáns és hiperpolarizáló tulajdonsága miatt a CNP endotélfüggő hiperpolarizáló faktorként (EDHF) is számításba jöhet. A hiperpolarizáló tulajdonság bizonyítása érdekében elektrofiziológiai méréseket végeztünk sertés koszorúéren. A nyugalmi membránpotenciált minden mérés előtt meghatároztuk, és ezt tekintettük alapvonalnak. A CNP hiperpolarizáló hatása  $1,4 \mu\text{M}$  koncentrációnál volt maximális, a nyugalmi membránpotenciált  $-49,79 \pm 1,4 \text{ mV}$ -ról  $-53,12 \pm 1,2 \text{ mV}$ -ra csökkentette ( $n=15$ ). Ez az eredmény egyértelműen bizonyítja az endogén peptid hiperpolarizáló hatását sertés koszorúéren.

#### 3.1.2.4. A CNP vazorelaxáns és hiperpolarizáló hatásának összevetése

A CNP simaizom membránt hiperpolarizáló és értónust csökkentő hatása közötti összefüggést a két paraméter szimultán mérésével bizonyítottam. A patkány mezenteriális artéria tónusát noradrenalinral növeltem, majd az intracelluláris mikroelektród bevezetése után CNP-t (166-1,6  $\mu\text{M}$ ), majd acetilkolin (10  $\mu\text{M}$ ) alkalmaztam. A CNP 500 nM-os koncentrációban már jól detektálható vazorelaxációt, 1,6  $\mu\text{M}$  koncentrációban vazorelaxációt és hiperpolarizációt okozott. 1,6  $\mu\text{M}$  CNP hiperpolarizáló hatása -3,7 mV volt, ami a sertés koszorúéren kapott eredményekkel nagy hasonlóságot mutat. Az acetilkolin tovább hiperpolarizálta a vizsgált simaizomsejtet ( $\Delta U = -12,7$  mV).

#### 3.1.3. Az OR-2828 hatásának vizsgálata

##### 3.1.3.1. Az OR-2828 hatása sertés koszorúér izometriás tónusára

Az OR-2828 koncentrációfüggő (0,38  $\mu\text{M}$  – 230,6  $\mu\text{M}$ ) relaxációt váltott ki KCl-dal (30 mM) prekontrahált sertés koszorúereken. A számított maximális relaxáció 78,1% volt, a vegyület  $EC_{50}$  értéke ezen a modellen 72,2  $\mu\text{M}$ -nak adódott.

3.1.3.2. Az OR-2828 membránpotenciálra gyakorolt hatásának összevetése a CNP-vel és a levosimendánnal sertés koszorúér simaizomszövetén

A hiperpolarizáló hatás számításához minden mérés előtt sor került a nyugalmi membránpotenciál felvételére, ami a CNP adása előtt  $-49,9 \pm 0,92$  mV ( $n=17$ ) volt. A referenciaszerként alkalmazott CNP (1,4  $\mu\text{M}$ )  $-3,6 \pm 0,38$  mV ( $n=17$ ) hiperpolarizáció kiváltására volt képes. A kiindulási membránpotenciál értékei hasonlóak voltak az OR-2828 és a levosimendan vizsgálata során is. Az OR-2828 (60, 120, 180  $\mu\text{M}$ ) koncentrációfüggően csökkentette a nyugalmi membránpotenciált, sorrendben  $-1,8 \pm 0,35$  mV ( $n=14$ ),  $-2,6 \pm 0,81$  mV ( $n=10$ ) és

-2,3±0,99 mV (n=12) hiperpolarizáció létrehozásával. Az OR-2828 60 µM-os koncentrációja szignifikánsan kisebb hatást váltott ki, mint a CNP (1,4 µM). A levosimendan maximális hatását 3,7 µM koncentrációban fejtette ki (-1,82±0,44 mV; n=22), de az általa létrehozott membránpotenciál változás mindhárom vizsgált koncentrációban szignifikánsan kisebbnek bizonyult a referencia CNP hatásától.

#### 3.1.3.3. Korreláció az OR-2828 hiperpolarizáló és relaxáló hatása között

Az OR-2828 60 µM-os koncentrációja által kiváltott relaxáció és hiperpolarizáció közötti korrelációt vizsgáltam. A lineáris regresszió eredménye ( $r=0,75$ ,  $p<0,01$ ) azt mutatja, hogy 1 mV hiperpolarizáció 4,2 % relaxáció létrejöttéért felelős. Az összefüggés 18,7 %-nál nagyobb mértékű relaxáció esetében áll fenn, ami arra utal, hogy a szer kis koncentrációban nem hiperpolarizáló mechanizmussal hat.

#### 3.1.3.4. Az OR-2828 eltérő dózisaival által létrehozott relaxáció és hiperpolarizáció összehasonlítása

Az OR-2828 vazorelaxáns és hiperpolarizáló hatását ugyanabban a koordinátarendszerben, a maximális hatás figyelembevételével ábrázoltam. A relaxáció dózis-hatás görbéje a vizsgált koncentrációk esetében fedti a hiperpolarizáció dózis-hatás görbéjét. A CNP hatásához képest az OR-2828 szélesebb koncentrációtartományban képes hiperpolarizálni a simaizmot. A szintetikus vegyület továbbá a félmaximális relaxációt kiváltó hatásnál kisebb koncentrációban is képes a membránpotenciál megváltoztatására, ellentétben a CNP-vel.

3.1.3.5. A feszültségfüggő kálium csatorna blokkoló 4-aminopiridin hatása az OR-2828 indukálta relaxációra

A 4-aminopiridinnel (5 mM) való előkezelés csekély, nem szignifikáns mértékben növelte meg a KCl-dal kiváltott kontrakció mértékét. A 4-aminopiridin gátolta a 41,6 és 117,2  $\mu\text{M}$ -os koncentrációjú OR-2828 relaxáló hatását. A  $K_v$  csatorna gátlás eredménye 41,6  $\mu\text{M}$  OR-2828 koncentráció esetében  $44,0 \pm 8,52\%$  v.s.  $30,3 \pm 5,17\%$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ), 117,2  $\mu\text{M}$  OR-2828 esetében  $65,6 \pm 1,34\%$  v.s.  $52,3 \pm 3,15\%$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ) volt. A 230,6  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban alkalmazott OR-2828 hatását a 4-aminopiridin előkezelés nem befolyásolta.

### **3.2. Rezisztencia típusú ér – humán pénisz artéria**

3.2.1. A CNP vazorelaxáns hatása humán pénisz artériákon

Az ép endotéllel rendelkező, NO-szintáz gátló L-nitro argininnel ( $10^{-4}$  M) és ciklooxygenáz gátló indometacinnal ( $10^{-5}$  M) előkezelt, fenilefrinnel prekontrahált artériákat a CNP (0,01–1 mM) koncentráció függően relaxálta. A dózis-hatás görbék reprodukálhatóak voltak, és alakjuk deendotelizált preparátumok esetében sem változott. A mért maximális relaxáció  $68 \pm 11\%$  volt, melyet a peptid 1  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban váltott ki.

3.2.2. A CNP hiperpolarizáló hatása izolált humán pénisz artériákon

A simaizom nyugalmi membránpotenciálja  $-44,8 \pm 1,3$  mV ( $n=12$ ) volt. Az ép endotéllel rendelkező preparátumokon az Ach (10  $\mu\text{M}$ ) hiperpolarizálta a simaizomsejt membránt ( $\Delta U = -5,2 \pm 0,9$  mV;  $n=6$ ), míg a CNP azonos mértékű relaxációt kiváltó koncentrációja (1,4  $\mu\text{M}$ )  $-2,5 \pm 0,5$  mV ( $n=10$ ) hiperpolarizációt váltott ki. Az endotél mechanikai úton való eltávolítása az Ach indukálta



potenciálváltozás eltűnését eredményezte ( $\Delta U=0,2\pm 0,3$  mV; n=7), míg a CNP hatása nem változott ( $\Delta U=-2,4\pm 0,6$  mV; n=10).

3.2.3. A  $BK_{Ca}$  csatornák szerepének vizsgálata a CNP indukálta relaxációban

A nagy konduktanciájú kalcium aktiválta kálium csatornák ( $BK_{Ca}$ ) szerepének vizsgálata nitrogén-monoxid szintáz és ciklooxygenáz gátlás ((L-nitro arginin (100  $\mu$ M) + indometacin (10  $\mu$ M)) után 0,1  $\mu$ M iberiotoxin segítségével történt. A CNP dózisfüggő relaxáló hatását az iberiotoxin előkezelés jelentősen gátolta a fenilefrinnel prekontrahált pénisz érgyűrűkön, ami egyértelműen jelzi, hogy a  $BK_{Ca}$  csatornák szerepet játszanak a CNP vazorelaxáns hatásának kifejlődésében.

## 4. ÖSSZEFOGLALÁS

### 4.1. Konduktancia típusú erek

1, Igazoltam a CNP vazorelaxáns hatását patkányból származó carotis, mezenteriális és femorális artérián.

2, A CNP mind ép, mind endotéliumtól megfosztott sertéskoszorúér preparátumokon azonos hatásmaximummal és azonos koncentrációban hozott létre értónuscsökkenést, ami a peptid endotéliumtól független relaxáló tulajdonságát igazolja. Ez azt mutatja, hogy a vazorelaxáns hatás létrejöttéhez nincs szükség az endotéliumból felszabaduló prosztaglandinokra és nitrogén-monoxidra. A kísérleti elrendezés az endoteliális funkció romlását szimulálja, mely állapotban a CNP értónus szabályozó szerepe előtérbe kerül a helyi érspazmus kivédésében. A CNP fontosságát csökkent endotél funkcióval

rendelkező éren *in vivo* vizsgálatok is igazolták, ugyanis a peptidet érkárosodás - atherosclerotikus plakkok - környezetében is kimutatták sertésen; illetve a peptidet kódoló gént humán koszorúér simaizomsejtekben az atherosclerosis kezdeti és előrehaladott fázisában is megtalálták. Ép endotéllel rendelkező éren az endotelin receptor blokkoló PD142893 növelte a vazorelaxáció mértékét. A jelenség hátterében feltehetően az endotelin és a CNP közt fennálló funkcionális antagonizmus áll.

3, A neutrális endopeptidázt gátló szerekkel (foszforamidon/tiorfán) történő előkezelés CNP-indukálta relaxációt potencírozó hatását bizonyítottam sertés koszorúéren mind endotélium jelenlétében, mind annak hiányában. Az endotelin konvertáló enzim gátló tulajdonsággal is rendelkező foszforamidon, ép endotéllel rendelkező érgyűrűkön, nagyobb mértékben növelte a relaxáció mértékét, mint a tiorfán. Ez a megfigyelés megerősíti az endotelin és a CNP közötti antagonizmust.

4, Igazoltam a CNP hiperpolarizáló hatását sertés koszorúér simaizomsejtjein. A mért hiperpolarizáció maximuma az ismert inodilátor levosimendán esetében kisebbnek bizonyult, de az új vegyület (OR-2828) által kifejtett membránpotenciál változás a CNP-hez hasonló mértékű volt.

5, Az OR-2828 vazorelaxáns és hiperpolarizáló hatása közt korrelációt mutattam ki sertésből izolált koszorúéren. A feszültség-függő kálium csatorna blokkoló 4-aminopiridin gátolta az OR-2828 vazorelaxáns hatását, ami a  $K_v$  csatornák értónus-csökkentésben betöltött szerepére utal.

## 4.2. Rezisztencia típusú erek

6, Igazoltuk, hogy a CNP az endotélium-függő hiperpolarizáló faktor tulajdonságait mutatja izolált humán pénisz intracavernosus artérián. Direkt elektrofiziológiai méréssel bizonyítottam, hogy a CNP simaizomsejt hiperpolarizáló tulajdonsággal rendelkezik. A hiperpolarizáció deendotelizált preparátumon is létrejött, az acetilkolin endotél hiányos éren nem mutatott ilyen hatást.

7, Az értónusmérések eredményei szerint a CNP vazorelaxáns hatását előzetes ciklooxygenáz és NO-szintáz gátlás után is kifejti. A létrejött relaxáció mértékét a kalcium aktiválta  $K^+$  csatorna blokkoló charybdotoxin + apamin kombinált előkezelés csökkentette. A CNP vazorelaxáns hatásának kialakulásában tehát a három kalcium aktiválta  $K^+$  csatorna típus ( $BK_{Ca}$ ,  $IK_{Ca}$ ,  $SK_{Ca}$ ) egyaránt szerepet játszhat.

## 5. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm prof. Dr. Papp Gyulának és prof. Dr. Varró Andrásnak a folyamatos szakmai támogatást, és azt a lehetőséget, hogy PhD hallgatóként bekapcsolódhattam a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetének kutatómunkájába.

Külön köszönöm témavezetőm, Dr. Pataricza János munkáját, aki mindig készséggel segített és hasznos tanácsokkal, ötletekkel látott el munkám során. Komplex látásmódjával és szerteágazó tudásával szívesen segített a felmerülő problémáim megoldásában, a technikai nehézségek áthidalásától a szakirodalom eredményeinek értelmezéséig. Támogatása nagyban hozzájárult kutatói szemléletem fejlődéséhez.

Tiszteletemet és megbecsülésemet fejezem ki Krassói Irén biológusnak, aki megosztva velem tudásának egy részét bevezetett az elektrofiziológiai mérések világába. A sikeres munkámhoz nemcsak tudományos téren, hanem emberileg is támaszt nyújtott. Önzetlen segítsége és precíz irányítása nélkül aligha lett volna kivitelezhető a dolgozatban szereplő több alapvető mérés.

Köszönöm Dr. Kun Attilának a rezisztencia erek tónusmérése során adott hasznos tanácsait és kooperatív munkáját.

Szintén köszönöm Dr. Ulf Simonsennek, a dániai Aarhusi Egyetem Farmakológiai Intézetéből, hogy technikai háttérrel biztosított az értónus és membránpotenciál párhuzamos méréséhez.

Köszönöm Süliné Tóth Zsuzsanna asszisztensnek a pontos, megbízható munkáját, valamint Horváth Gyula technikusnak és Girst Gábor rendszergazdának a technikai segítségét.

Köszönettel tartozom a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet valamennyi olyan dolgozójának, aki akár szakmailag, akár emberileg támogatott munkámban és dolgozatom elkészítésében.