

**Gyógyszervegyületek elektrofiziológiai szűrése nagy
hatáskereszt-metszetű („*semi high-throughput*”)
rendszeren**

**Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudomány Kar
Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézete**

és

MTA-SZTE Keringésfarmakológiai Kutatócsoport

Igazgató és kutatócsoport-vezető: Prof dr. Varró András

**6720 Szeged, Dóm tér 12., Pf. 427
Tel.: (62) 545 683, 545 682 Fax: (62) 545 680**

E-mail: varro.andras@med.u-szeged.hu

Web: www.szote.u-szeged.hu/phcol



2013

1. Bevezetés

A kardiovaszkuláris betegségek következtében fellépő hirtelen szívhalál ma a fejlett ipari országokban, így hazánkban is élen jár a halálteki statisztikákban. Ezek közül is kiemelkedő problémát okoznak a malignus szívritmuszavarok. A legsúlyosabb kamrai szívritmuszavar a kamrafibrilláció évente több mint 400 000 ember halálát okozza az USA-ban. A szükséges mértékű szívperctér fogat fenntartásának alapvető feltétele a szívizomzat megfelelő mechanikai aktivitása az összehúzódás és elernyedés precíz időbeli/térbeli szervezése. A szinkronizált összehúzódást a szívizomzaton végigterjedő elektromos depolarizáció (akciós potenciál, AP) iniciálja. A szívizom gyors kontrakcióját a sejtek intracelluláris Ca^{2+} koncentrációjának lökészerű emelkedése (Ca^{2+} tranziens), a szívkamrák kellő telődése szempontjából ugyancsak létfontosságú gyors relaxációját a szisztole alatt megemelkedett $[Ca^{2+}]_i$ diasztolés szintre történő, ugyancsak gyors lecsökkentése biztosítja. Amennyiben a szívkontrakció vagy -relaxáció precízen szabályozott komplex mechanizmusa tartósan sérül, súlyos, életveszélyes állapot alakulhat ki, amely külső, terápiás beavatkozás hiányában általában halálhoz vezet. Sajnos hatékony gyógyszeres terápia nem létezik, mert a jelenleg használt gyógyszerek nagy része vagy nem elég hatékony a ritmuszavarok kezelésére, vagy jelentős részük komoly proaritmiás mellékhatással rendelkezik. nagy igény van új antiaritmiás hatású vegyületek fejlesztésére.

A gyógyszerfejlesztés hosszadalmas, és nem utolsósorban költségigényes munka. Több ezer vegyület szintézise és ellenőrzése szükséges egy hatékony vegyület beazonosítására. Ismert gyógyszerbiztonsági előírás, hogy minden nem kardiális vegyületet is le kell szűrni a HERG csatornára (szív késői egyenirányító káliumáramának gyors komponense), ugyanis ennek gátlása az egyik ismert tényező az életet veszélyeztető súlyos kamrai aritmiák kialakulásáért az *un*. Torsades de Pointes típusú polimorf kamrai tachykardiáért. Ez jelentős *in vitro* elektrofiziológiai kapacitást igényel. A z elmúlt években megjelentek az első automatizált nagy hatás-keresztmetszetű szűrőrendszerek. Vannak kifejezetten nagy gyógyszergyári igényeket kielégítő rendszerek (valódi *high-throughput* rendszerek), amelyek akár évi több ezer vegyület szűrésére is alkalmasak. Ugyanakkor megjelentek az olyan rendszerek, amelyek kifejezetten az akadémiai szféra alkalmazott kutatás-fejlesztési rendszerek igényeihez mértek, vagyis amelyek jelentősen megemelik a manuális patch-clamp technika lehetőségeit és *kb.* egy kutatási pályázatban megfogalmazott igényeket (max. 200-500 vegyület/év) szűrésre alkalmasak. Ezeket nevezzük „*semi high-throughput*” rendszereknek. Ezek a rendszerek alkalmasak bármilyen transzformált sejtvonalon történő vegyületek szűrésére szoba és fiziológiás hőmérsékleten egyaránt. Alkalmas új hatékony vegyületek szűrésére, de gyógyszerbiztonsági kutatások elvégzésére is (HERG szűrés).

Az SZTE Farmakológiai és Farmakoterápiái Intézet és a társult MTA-SZTE Keringéscsatornák Farmakológiai Kutatócsoport a közelmúltban két a Nemzeti Kutatási és Technológiai Hivatal, illetve ma már a Nemzeti Fejlesztési Hivatal által támogatott infrastruktúra és célzott kutatásfejlesztési és innováció projekt kapcsán beszerzett és ***PROTOTÍPUSKÉNT*** beüzemelt egy ilyen *semi high-throughput* rendszert, amelynek segítségével szívesen ko-operációs és megbízásos, partnereket egyaránt.

A beszerzéseket a következő két projekt segítette elő és tette lehetővé:

NCX modulátor gyógyszerjelöltek elektrofiziológiai hatásainak vizsgálatára alkalmas nagy teljesítményű műszeregyüttes beszerzése (NCXPATCH)

Nyilvántartási száma: REG-DA-09-1-2009-0022 (OMFB-00348/2010)

Témavezető: Dr. Varró András

Támogatási összeg 22 000 eFt

Projekt időtartama: 2010.04.01-2011.02.28

„Aritmiák és szívelégtelenség kezelésére alkalmas Na^+/Ca^{2+} kicserélő gátlószerke szintézise és gyógyszerjelöltté fejlesztése” (NCXINHIB)

Nyilvántartási száma: REG-DA-09-2-2009-0115 (OMFB-00337/2010)

Témavezető: Dr. Jost Norbert László

Támogatási összeg 57 000 eFt

Projekt időtartama: 2010.06.01-2013.06.30

A műszer ismertetése:

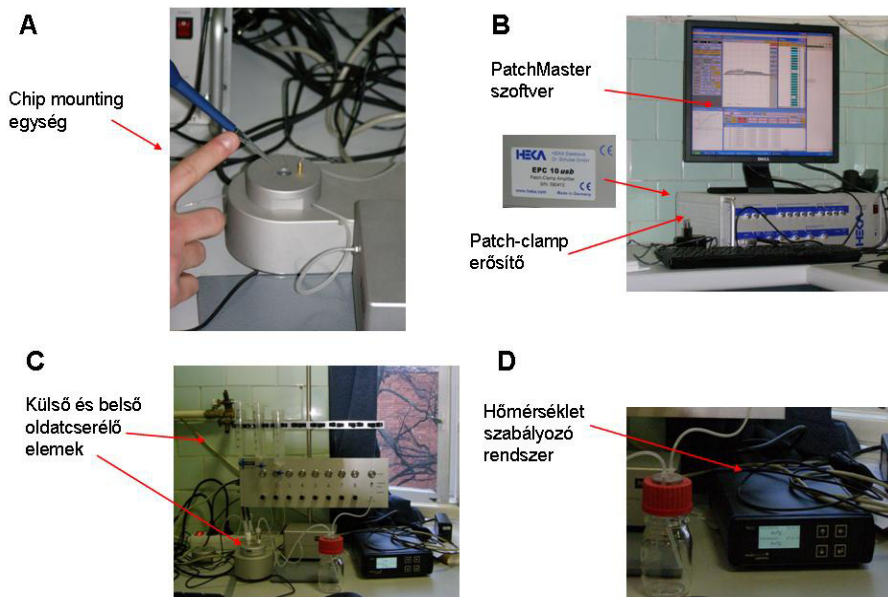
A Port-a-Patch egy kisméretű komplett egycsatornás patch-clamp berendezés amelyet a Nanion Technologies gyárt és forgalmaz. A berendezés a patch clamp technika egész-sejtes (whole cell), „cell attached” és perforált patch konfigurációjában üzemel, működése a hagyományos patch clamp technikától eltérő ún. planar patch technológián alapul. Ez a rendszer mikropipetta helyett egy vékony üveglemezben levő mikrométernyi átmérőjű nyílást (glass chip) használ a kísérlethez, itt történik a gigaohm seal és az egészsejtes konfiguráció kialakítása. A rendszert számos sejtvonalon sikeresen validálták. A Port-a-Patch berendezést HEKA EPC-10 patch clamp erősítővel, egy számítógéppel és szoftvercsomaggal együtt szállítják. A tápoldatok kezelését manuálisan lehet elvégezni, míg a „gigaohm seal” és az egészsejtes konfiguráció létrehozásához szükséges szívás vezérlését a számítógép végzi, ezáltal a berendezés megkönnyíti és jelentősen felgyorsítja a patch-clamp kísérleteket ütemezését.

2. Javasolt szolgáltatásaink:

Különböző kardiális és nem kardiális vegyületek elektrofiziológiai vizsgálata/szűrése *Port-a-patch* típusú félautomatizált patch-clamp berendezés (*semi high-throughput*) transzformált sejtvonalakon

A félautomatizált azt jelenti, hogy a sejteket kézzel kell elhelyeznünk a szervfürdőbe, és onnantól kezdve a berendezés számítógép vezérléssel automatikusan elvégzi a kísérletet. A berendezés egy komplex több elemből álló egységként működik és a következő elemeket tartalmazza:

- **Chip mounting egység** Faraday toppal, elektróda készlettel, szívás vezérlő egységgel, csövekkel, USB-kábellel, tápegységgel, elektrofiziológiai tápoldat készlettel
- **Patch-clamp erősítő**
- **Asztali számítógép** + TFT monitor
- **Vezérlő, és kiértékelő szoftver**



1 ábra. A projekt során beszerzésre került *Port-a-Patch* műszeregyüttes. **A** mező. *Chip mounting* egység Faraday kalitkával, elektróda készlettel, szervfürdő (sejt) káddal. **B** mező. HEKA

EPC-10 típusú PatchMaster szoftverrel vezérelt patch-clamp erősítő. **C. mező.** Belső és 8 csatornás külső oldatcserélő egységek. **D. mező.** Hőmérséklet szabályzó egység.

Fentiek részletezve:

Chip mounting egység (1A. ábra). A rendszer áteresztő képessége: 20 – 50 mérés/nap

Patch-clamp erősítő (1B ábra):

USB porton keresztül szoftvervezérlésre alkalmas **HEKA-EPC 10** USB típusú biológiai erősítő. Ebben az esetben nincs szükség egy különálló analóg-digitál ill. digitál-analóg interfész használatára, mivel ez a patch clamp erősítővel egy készülékbe van integrálva és így az erősítő USB porton kommunikál a számítógéppel.

PatchMaster típusú vezérlőszoftver (1B ábra): A szoftver alkalmas egyaránt a mérési kísérletek online vezérlésére, ill. a mérési eredmények online és offline számítógépes kiértékelésére és prezentálására.

Dell típusú asztali számítógép Windows XP Professional operációs rendszerrel és 19" TFT monitorral és kötelező perifériákkal.

Perfúziós rendszer az extracelluláris (8 csatornás) és internális tápoldatok automatizált kezeléséhez (1C ábra).

- Egy minimum nyolc csatornás manuálisan illetve számítógépes szoftver által is vezérelhető tápoldat kezelő rendszer.
- Szelepvezérlő panel
- Fecskendőtartó állvány

3. A rendszert bemutató mintakísérletek

Tesztvegyületek vizsgálata *Port-a-Patch* rendszerrel HERG árammal stabilan transzformált HEK293 és Kv1.4 árammal transzformált CHO sejtvonalakon

hERG-HEK-293 sejtvonal: Human Embryonic Kidney sejtvonal, melyet a hERG csatorna génjével stabilan transzfektáltak. Forrás: Cell Culture Service (Hamburg, Németország, <http://www.cellcultureservice.com>).

A sejteket 37°C-on, 5% CO₂ szint mellett tartottuk fenn. A sejtek szaporításához IMDM (Lonza) médiumot alkalmaztunk, kiegészítve 10% FetalClone II-vel (HyClone), 2 mM L-glutaminnal (Invitrogen), 1 mM Na-piruváttal (Invitrogen) és 500 µg/ml G418-cal (Invitrogen)..

A sejteket 37°C-on, 5% CO₂ szint mellett tartottuk fenn. A sejtek szaporításához F12 (Invitrogen) médiumot használtunk, kiegészítve 10% FetalClone II-vel (HyClone) és 500 µg/ml higromicinnel (PAA). A méréseket sejtszuspenzió végeztük. A szuszpenzió előállításához a sejteket kétszer PBS-el (Invitrogen) mostuk, majd tripszin-EDTA (PAA) segítségével 2-3 percig emésztettük. A tripszint MEM (Invitrogen) és 10% FetalClone II (HyClone) keverékkel blokkoltuk. Kétszeri centrifugálás (2 perc, 100 g) után a sejteket external oldatban reszuszendáltuk.

Elektrofiziológiai mérések

A patch-clamp méréseket szobahőmérsékleten és 37 C-on, planár technikával végeztük, whole-cell konfigurációban, manuális egycsatornás Porta-Patch (Nanion Technologies GmbH, München, Németország) berendezéssel.

Oldatok

A patch-clamp mérések során mindkét sejtvonal esetében az alábbi oldatokat használtuk:

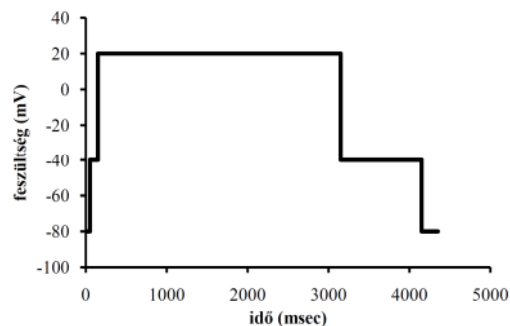
Internal oldat: 50 mM KCl, 10 mM NaCl, 60 mM KF, 20 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7,2 (KOH)

External oldat: 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 5 mM glükóz-monohidrát, 1 mM MgCl₂, 3 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7,4 (NaOH)

Seal enhancer oldat: 80 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 35 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7,4 (NaOH)

Feszültségprotokoll

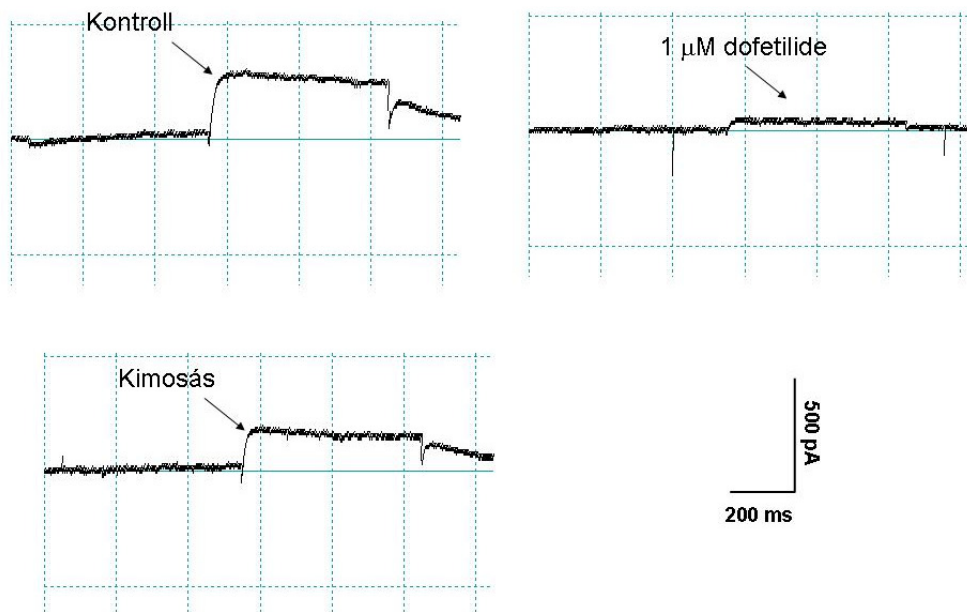
A pulzusprotokoll hERG csatorna vizsgálatok estében az 50 ms hosszúságú nyugalmi potenciált követő 100 ms-ig tartó -40 mV-os prepulzussal indult, később az itt mért áramot referenciaként használtuk. Ezután 3 másodpercig +20 mV-os potenciált alkalmaztunk, majd -40 mV-os feszültséget 1 másodpercig. Végül 200 ms ideig visszatértünk a nyugalmi potenciálra. A **2. ábra** mutatja az alkalmazott feszültségprotokollt.



2. ábra. A hERG csatorna vizsgálatok esetén alkalmazott feszültségprotokoll.

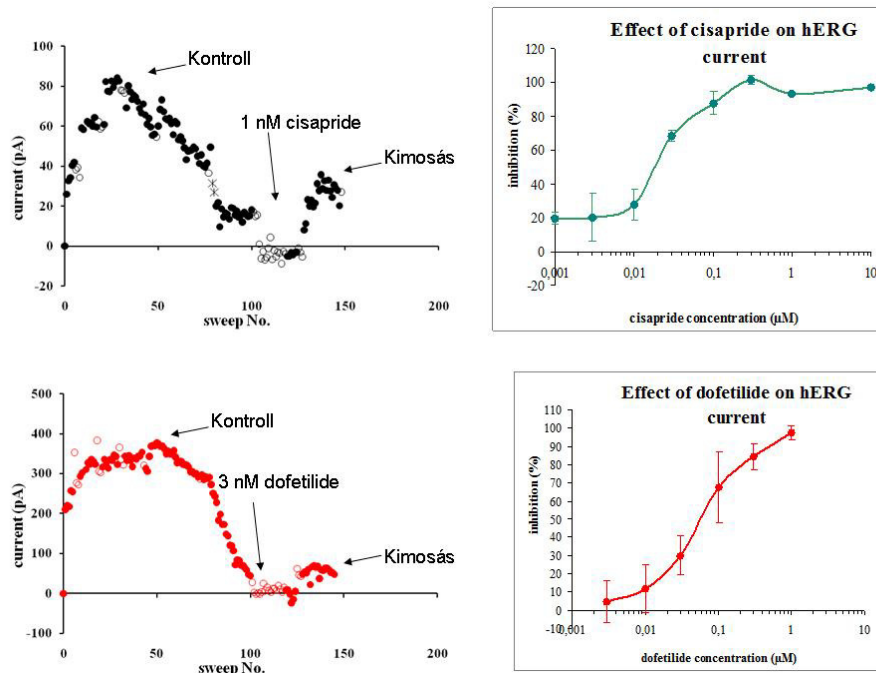
Megvizsgáltuk számos új *ill.* ismert antiaritmiás hatású vegyületnek (pl. I_{K,ACH} gátló NIP142, I_{Kr} gátló cisapride, terfenadine, sotalol és dofetilide, I_{NaL} gátló ranolazin, *stb*) a hatását a HERG áramra. Mint a mellékelt 3-6. ábrák is igazolják 2 hónap alatt sikerült az új berendezéssel mindezen vegyületek dózis-hatásgörbéit meghatározni.

1 μ M dofetilide hatása a HERG áramra stabilan transzformált HEK sejtvonalon

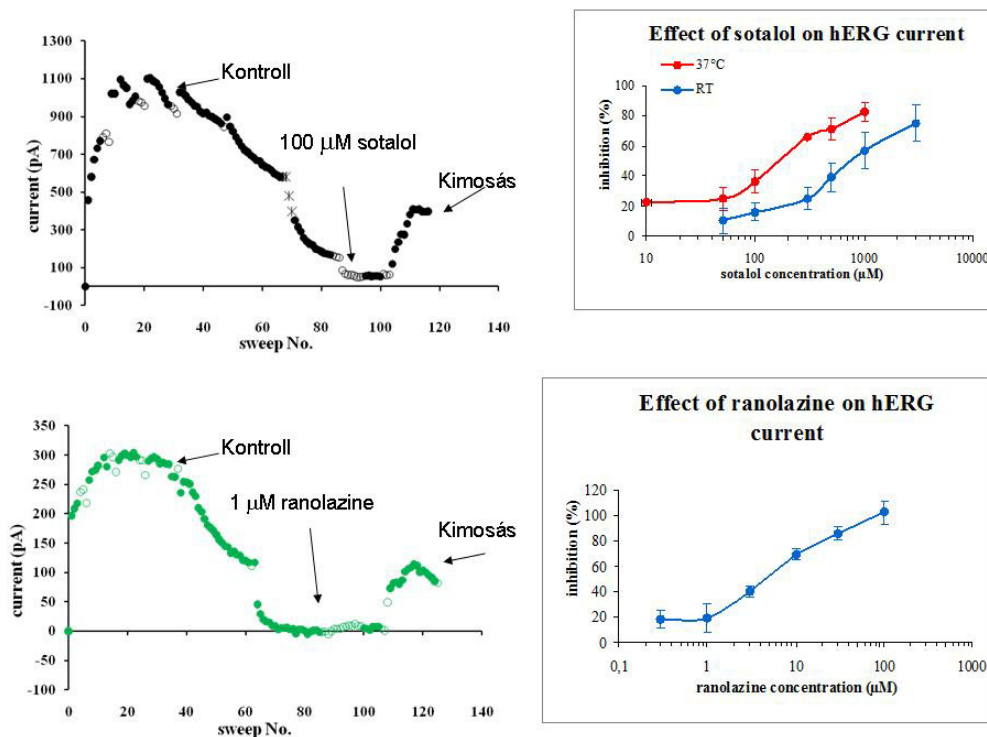


3. ábra. Dofetilide hatása a HERG áramra a HERG csatornával stabilan transzformált HEK. Eredeti áramgörbe regisztrátumok kontroll, 1 μ M dofetilide alkalmazása

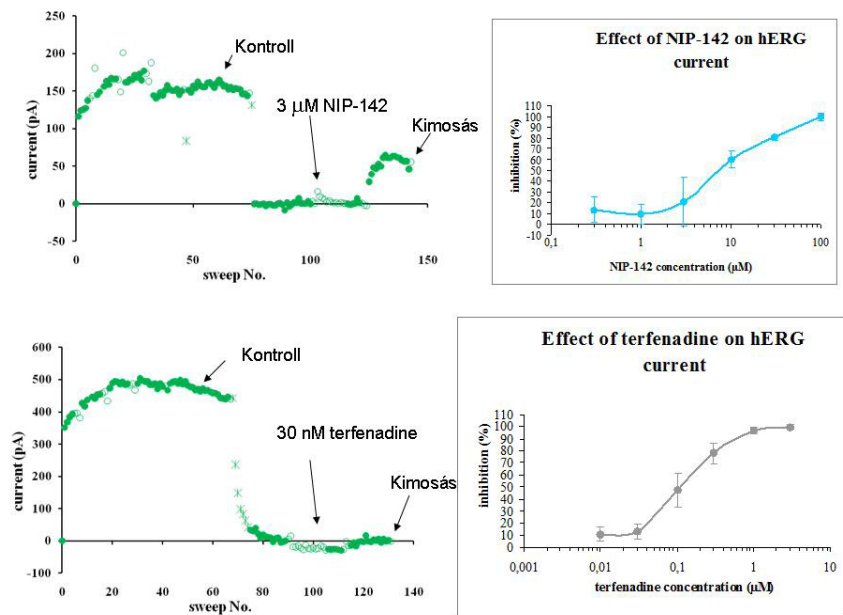
során, és a szer kimosása után. A felvétel a projektben beszerzett új *Port-a-Patch* félautomatizált berendezéssel készült, az MTA Keringéscsökkentőfarmakológiai Kutatócsoport munkatársai által.



4. ábra. 1 nM cisapride (felső mezők) és 3 nM dofetilide (alsó mezők) hatása a HERG áramra HERG csatornával stabilan transzformált HEK sejtvonalon. Áram-idő regisztrátumok (bal oldali mezők) kontroll, szer és kimosás körülmények között. Szer dózis-hatás görbék (jobb oldali mezők) a HERG áramra.



5. ábra. 100 μM sotalol (felső mezők) és 1 μM ranolazine (alsó mezők) hatása a HERG áramra HERG csatornával stabilan transzformált HEK sejtvonalon. Áram-idő regisztrátumok (bal oldali mezők) kontroll, szer és kimosás körülmények között. Szer dózis-hatás görbék (jobb oldali mezők) a HERG áramra.



6. ábra. 1 nM cisapride (felső mezők) és 3nM dofetilide (alsó mezők) hatása a HERG áramra HERG csatornával stabilan transzformált HEK sejtvonalon. Áram-idő regisztrátumok (bal oldali mezők) kontroll, szer és kimosás körülmények között. Szer dózis-hatás görbék (jobb oldali mezők) a HERG áramra.

A berendezést a következő személyek felügyelik. Valamennyien a Szivelektrofiziológiai Munkacsoport tagja:

Prof Varró András, tanszékvezető egyetemi tanár
 Prof. Papp Gyula, emeritus professzor
 Dr. Virág László, tudományos főmunkatárs
 Dr. Jost Norbert László tudományos főmunkatárs
 Dr. Baczkó István, egyetemi docens
 Dr. Nagy Norbert tudományos munkatárs
 Molnár Imréné laboratóriumi aszisztens

és

Corici Claudia, Geramipoor Amir, Horváth András, Kohajda Zsófia, Kormos Anita, Szepesi Judit PhD hallgatók

