

A TOLPERIZON ÉS AZ L-TEANIN HATÁSA A GLUTAMÁT-JELÁTVITELRE

PhD értekezés

Lakatos Péter Pál

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Semmelweis Egyetem



Témavezető:

Szökő Éva, PharmD DSc,
egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Köles László, MD PhD,
egyetemi docens
Lekli István, PharmD PhD,
egyetemi docens

Komplexvizsga-bizottság elnöke:

Antal István, PharmD PhD,
egyetemi tanár

Komplexvizsga-bizottság tagjai:

Ducza Eszter, PharmD PhD,
egyetemi docens
Tóth Gergő, PharmD PhD,
egyetemi adjunktus

Budapest
2023

1. Bevezetés

A központi idegrendszer elsődleges serkentő neurotranszmittereként a glutamát számos élettani folyamatban bír döntő jelentőséggel. Fő receptora, az N-metil-D-aszpartát receptor (NMDAR) révén központi szerepet játszik a szinaptikus plaszticitásban, amely folyamat fontos adaptív változások alapja a központi idegrendszerben. Emellett mind a fokozott, mind a csökkent glutamát-jelátvitelt összefüggésbe hozták kórélettani változásokkal. Ma már jól ismert, hogy a fokozott glutamát-neurotranszmisszió szerepet játszik a neuropátiás fájdalom kialakulásában, míg az NMDAR csökkent aktivitása kognitív zavarok kiváltó oka lehet. Sajnos az említett kórképek hatékony kezelése jelenleg megoldatlan, hiszen a tünetek enyhítésére igazán alkalmas terápia egyik esetben sem áll még rendelkezésre.

A glutamát-jelátvitelt egy összetett, ko-agonistákat és transzportereket tartalmazó rendszer szabályozza, amely sok farmakológiai célpontot kínál a kutatók számára. Ezek működését számos vegyület képes lehet befolyásolni, beleértve olyan gyógyszer-molekulákat is, amelyeket ma eltérő indikációkban alkalmaznak, vagy amelyek pontos hatásmechanizmusa jelenleg nem ismert. A glutamát-jelátvitelről szerzett ismereteink gyarapodásával lehetővé válik az azt befolyásoló gyógyszerek újraértékelése és bevonása a neuropátiás fájdalom vagy kognitív zavarok terápiájába. Ez az úgynevezett gyógyszer *repurposing* ígéretes lehetőségeket kínál az említett kórképek

hatékonyabb kezelésére, hiszen a már forgalomban lévő gyógyszerek biztonságossága bizonyított, így kevesebb vizsgálatot igényelnek és hamarabb válhatnak alkalmazott terápiák részévé.

2. Célkitűzések

A tolperizon egy centrális hatású izomrelaxáns, amely pontos hatásmechanizmusa még nem ismert. Bár kevés preklinikai adat áll rendelkezésre, az eredmények arra utalnak, hogy hatását a preszinaptikus végkészülékeken fejti ki, befolyásolva a gerincvelői neurotranszmitter-felszabadulást és ezáltal a nociceptív glutamát-jelátvitelt. Az értekezésben bemutatásra kerülő kutatás egyik fő célja a tolperizon allodíniára, a neuropátiás fájdalom egyik fő tünetére, gyakorolt hatásának vizsgálata volt. Emellett tolperizon glutamát-jelátvitelre gyakorolt moduláló hatását, valamint az ezt magyarázó molekuláris mechanizmusokat is tanulmányoztuk.

Az *L*-teanin a tealevelek egyik fő, aktív összetevője. Bár kognitív képességekre gyakorolt előnyös hatásai jól ismertek, ezek pontos mechanizmusa nem tisztázott. Glutamát-jelátvitelre gyakorolt hatását régóta feltételezik, azonban mindeddig nem ismert a molekuláris célpont, amely magyarázná az *L*-teanin jótékony hatásait. Az értekezésben ismertetett kutatás további céljai közé tartozott az *L*-teanin aminosav-transzporterekre gyakorolt hatásának vizsgálata, hiszen ezek döntően befolyásolják az NMDAR két fő endogén ligandjának, a glutamát-nak és a *D*-szerinnek szinaptikus koncentrációját, szabályozva ezzel a receptor aktivitását és a szinaptikus plaszticitást.

3. Módszerek

A tolperizon antiallodinikus hatását egy neuropátiás fájdalom tanulmányozására alkalmas állatmodell segítségével vizsgáltuk. Részleges nervus ischiaticus-elkötésen (partial sciatic nerve ligation, pSNL) átesett hím, Wistar patkányokban mononeuropátiás fájdalom alakult ki. A neuropátiát kísérő mechanikus allodínia megjelenését az állatok fájdalomküszöb-csökkenése (paw pain threshold, PPT) jelezte, amelyet Randall-Selitto-teszt segítségével határoztunk meg, a műtéti beavatkozást követő 14. napon. Ezt követően az állatokat a vizsgált vegyületek (25, 50 vagy 100 mg/kg tolperizon vagy pregabalin) vagy izotóniás sóoldat egyszeri orális adagjával kezeltük. A vegyületek akut, antiallodíniás hatásainak megismerése érdekében a fájdalomküszöb értékeket kezelést követő 60., 120. és 180. percben ismét meghatároztuk, majd az állatokból cerebrospinális folyadék (CSF) mintát vettünk. A kontroll csoportban ál-operált állatokat használtunk.

A tolperizon neuronális glutamátfelszabadulásra gyakorolt közvetlen hatását patkány agyi szinaptoszómákon vizsgáltuk. A depolarizációt és az azt követő glutamátfelszabadulást 1 mM 4-aminopiridinnel vagy nagy koncentrációjú (33 mM) kálium-kloriddal váltottuk ki.

Az *L*-teanin glutamátfelvételre gyakorolt hatását szintén az *in vitro* neurotranszitter-felszabadulás modellen vizsgáltuk. Emellett, az *L*-teanin *D*-szerin felvételre

gyakorolt hatását SH-SY5Y neuroblasztóma sejteken vizsgáltuk, hiszen ez a sejtvonal az asztrociták *D*-szerin transzportjának tanulmányozására alkalmas *in vitro* modell.

A CSF-minták glutamát-szintjét, a szinaptoszómákból felszabaduló glutamát-tartalmat, valamint az SH-SY5Y sejt kivonatok *D*-szerin és *L*-teanin koncentrációját a laboratóriumunkban korábban kifejlesztett módszer alapján kapilláris elektroforézis lézer indukált fluoreszcencia detektálással (capillary electrophoresis – laser induced fluorescence, CE-LIF) határoztuk meg. A fehérje-mentesített mintákból NBD-F segítségével fluoreszcens származékot képeztünk, majd lézer indukált fluoreszcencia detektorral kapcsolt P/ACE MDQ Plus kapilláris elektroforézis rendszerrel elemeztük. A gerjesztési és emissziós hullámhossz 488, illetve 520 nm volt. A statisztikai elemzéseket GraphPad 8.0 szoftverrel végeztük.

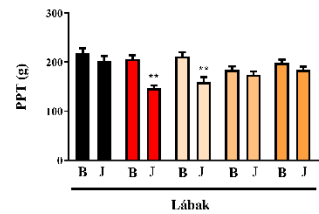
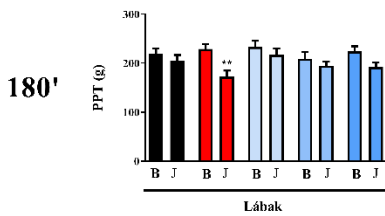
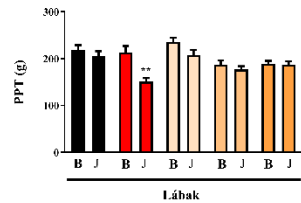
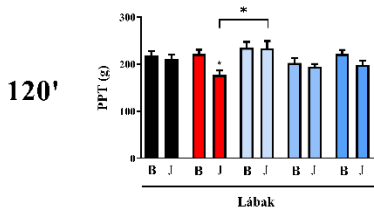
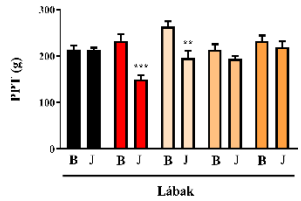
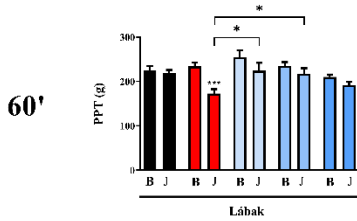
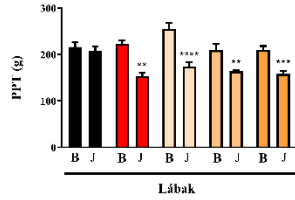
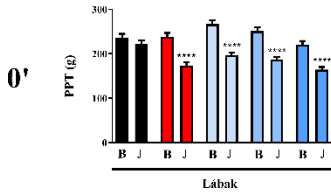
4. Eredmények

A tolperizon valamennyi vizsgált dózisa (25, 50 és 100 mg/kg; per os) képes volt helyreállítani az idegkárosodás következtében kialakult mechanikus allodíniát. A pozitív kontrollként alkalmazott pregabalin, amely elsővonalbeli gyógyszer a neuropátiás fájdalom terápiájában, nagyobb dózisaival (50 és 100 mg/kg; per os) a tolperizonhoz hasonlóan szintén növelte a fájdalomküszöböt. A kezeléseket követően mindhárom vizsgált időpontban (a beadást követő 60., 120. és 180. perc) szignifikáns antiallodinikus hatás volt megfigyelhető. A mechanikus allodínia a vártnak megfelelően nem szűnt meg a csak vívőanyaggal kezelt patkányok esetén, mivel ebben a csoportban a műtött lábak PPT-értékei szignifikánsan alacsonyabbak maradtak az álműtött csoportban mértekéhez képest (1. ábra).

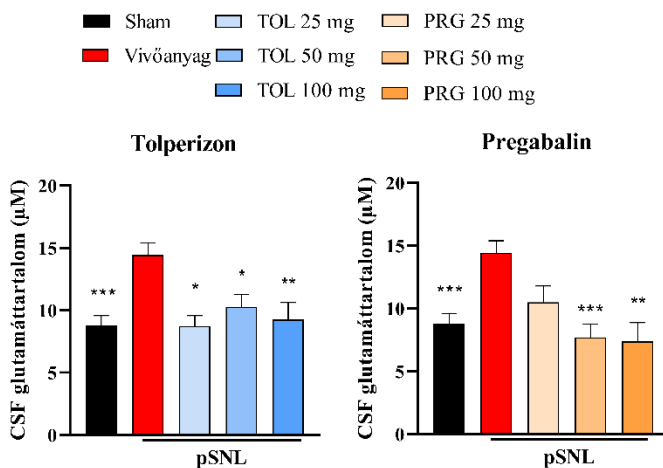
A CSF glutamát-szintjének jelentős emelkedése volt megfigyelhető az pSNL műtéten átesett, neuropátiás patkányok esetén. Az egyszeri tolperizon-kezelést követően minden vizsgált dózisban normalizálódott az idegkárosodás következtében megemelkedett CSF glutamát-szint 180 perccel a beadást követően (2A ábra). A tolperizonhoz hasonlóan az egyszeri pregabalin-kezelés nagyobb dózisok mellett (50 és 100 mg/kg) szintén csökkentette a CSF glutamát-szintet (2B ábra).

Tolperizon

Pregabalin



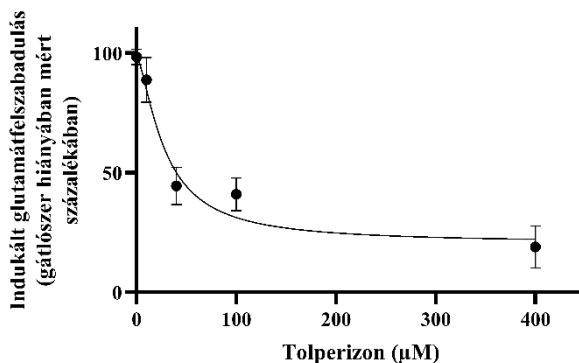
1. ábra. A tolperizon (bal oldali oszlop) és a pregabalin (jobb oldali oszlop) antiallodinikus hatása akut kezelést követően (25, 50, 100 mg/kg, per os). Az ábrák az állatok bal (egészséges, B) és jobb (operált, J) lábain mért PPT értékek átlagát (\pm S.E.M.) mutatják, grammban kifejezve, a tolperizon vagy pregabalin kezelés (60; 120; 180 perc) előtt (kiindulási érték) és után. A csillagok a bal (egészséges) lábhoz vagy a vivőanyaggal kezelt csoporthoz képest szignifikáns különbségeket jelölik (egyutas ANOVA, Newman-Keuls post-hoc teszt; ****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$). Minden kezelési csoportban 6-16 állat volt (2).



2. ábra. A pSNL műtétén átesett patkányból vett CSF minták glutamát-tartalma 14 nappal a műtét után. Az oszlopok a jelzett csoportok glutamát-koncentráció értékeinek átlagát (\pm S.E.M.) mutatják μM -ban kifejezve. A csillagok a vivőanyaggal kezelt csoporthoz képest szignifikáns különbségeket jelölik (egyutas ANOVA, Tukey post-hoc teszt; ****: $p < 0,001$; ***: $p < 0,01$; **: $p < 0,05$). Minden kezelési csoportban 6-18 állat volt (2).

A tolperizon szinaptikus glutamát-felszabadulásra gyakorolt közvetlen hatását patkány agyi szinaptoszómákon vizsgáltuk. A 4-aminopiridin által kiváltott glutamát-felszabadulást a tolperizon

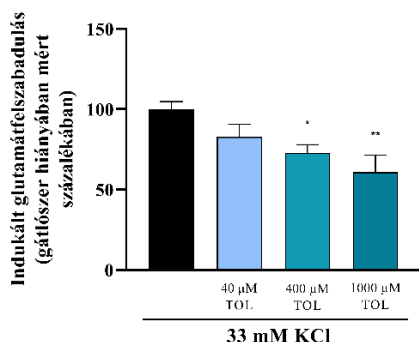
koncentrációfüggően gátolta, mely során már 40 μM tolperizon is jelentős csökkenést eredményezett (3. ábra).



3. ábra. A tolperizon (TOL) hatása 1 mM 4-aminopiridin által kiváltott glutamát-felszabadulásra patkány agyi szinapszómákból. Minden adatpontot normalizáltunk a stimulálatlan, alap glutamát-felszabadulással, és az adatokat a tolperizon hiányában tapasztalt, stimulált glutamát-felszabadulás százalékában ábrázoltuk (fekete oszlop). Minden oszlop a jelzett csoportokban mért, stimulált glutamát-felszabadulás értékek átlagát (\pm S.E.M.) mutatja százalékban kifejezve. A csillagok a tolperizon hiányában mért, stimulált glutamát-felszabaduláshoz képest szignifikáns különbségeket jelölik ($r^2 = 0.7580$). Minden kezelési csoportban 4-30 párhuzamos kísérlet volt (2).

Annak érdekében, hogy különbséget tudjunk tenni a tolperizon lehetséges nátrium-, és kalciumcsatorna-gátló hatása között, további kísérleteinkben a szinaptikus glutamát-felszabadulást 33 mM kálium-kloriddal váltottuk ki. Mivel kálium-klorid magas extracelluláris koncentrációja a kalciumáramok közvetlen aktiválásával képes depolarizációt előidézni, így a létrejött neurotransmitter-felszabadulás jobbra független a feszültségfüggő nátriumcsatornák aktivitásától. A kálium-

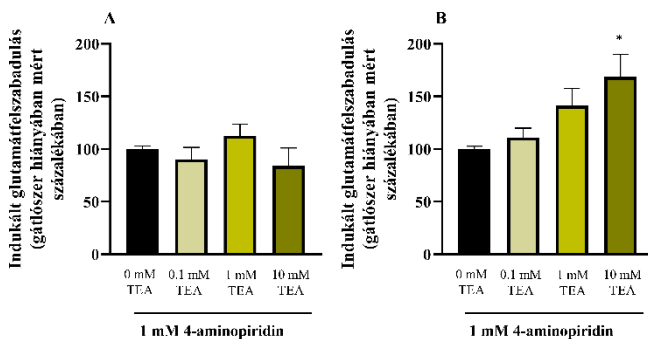
klorid alkalmazásával kiváltott glutamát-felszabadulást a tolperizon csak 400 μM koncentráció mellett tudta gátolni, míg a 4-aminopiridin által kiváltott felszabadulás esetén már egy nagyságrenddel alacsonyabb koncentráció (40 μM) mellett is szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető (4. ábra).



4. ábra. A tolperizon (TOL) hatása 33 mM kálium-klorid által kiváltott glutamát-felszabadulásra patkány agyi szinaptoszómákból. Minden adatpontot normalizáltunk a stimulálatlan, alap glutamát-felszabadulással, és az adatokat a tolperizon hiányában tapasztalt, stimulált glutamát-felszabadulás százalékában ábráztuk (fekete oszlop). Minden oszlop a jelzett csoportokban mért, stimulált glutamát-felszabadulás értékek átlagát (\pm S.E.M.) mutatja százalékban kifejezve. A csillagok a tolperizon hiányában mért, stimulált glutamát-felszabaduláshoz képest szignifikáns különbségeket jelölik (egyutas ANOVA, Tukey post-hoc teszt; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$). Minden kezelési csoportban 4-19 párhuzamos kísérlet volt (2).

Az *L*-teanin neuronális glutamát transzportra gyakorolt hatását szintén megvizsgáltuk patkány agyi szinaptoszómákon. Az *L*-teanin nem gátolta a glutamát-felszabadulást egyik vizsgált koncentrációban sem (5. ábra). Ezzel szemben a glutamát-felszabadulás

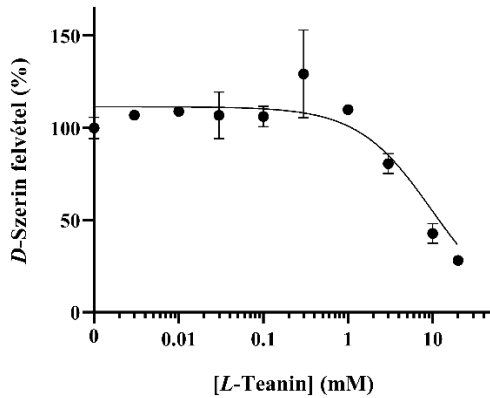
szignifikáns, koncentrációfüggő növekedése volt észlelhető, amely megszűnt DL-TBOA (DL-threo-benziloxiaszpartát) jelenlétében, amely a központi idegrendszer glutamát-transzportereinek (excitatory amino acid transporter, EAAT1-3) potens, szelektív gátlószere. Ezek az eredmények, valamint az *L*-teanin és a glutamát kémiai szerkezetei közt megfigyelhető szembeötlő hasonlóság arra utalnak, hogy az *L*-teanin a glutamát-transzporterek gyenge, kompetitív gátlószere.



5. ábra. Az *L*-teanin (TEA) hatása 1 mM 4-aminopiridin által kiváltott glutamát felszabadulásra 40 μ M *DL*-TBOA jelenlétében (A) vagy hiányában (B) patkány agyi szinaptoszómákból. Minden adatpontot normalizáltunk a stimulálatlan, alap glutamát-felszabadulással, és az adatokat az *L*-teanin hiányában tapasztalt, stimulált glutamát-felszabadulás százalékában ábráztuk (fekete oszlop). Minden oszlop a jelzett csoportokban mért, stimulált glutamát-felszabadulás értékek átlagát (\pm S.E.M.) mutatja százalékban kifejezve. A csillagok az *L*-teanin hiányában mért, stimulált glutamát-felszabaduláshoz képest szignifikáns különbségeket jelölik (egyutas ANOVA, Tukey post-hoc teszt; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$). Minden kezelési csoportban 4-19 párhuzamos kísérlet volt.

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk az *L*-teanin pro-kognitív hatását magyarázó egyéb lehetséges mechanizmusokat, megvizsgáltuk az *L*-teanin *D*-szerin transzportra gyakorolt hatását is. Az asztrociták *D*-szerin felvételének modellezésére SH-SY5Y neuroblasztóma sejteket alkalmaztunk, mivel ez a sejtvonal expresszálja azokat a semleges aminosav cseretranszportereket (ASCT1, ASCT2), amelyek szabályozzák az extracelluláris *D*-szerin koncentrációt a központi idegrendszerben. Kísérleteink során az *L*-teanin koncentrációfüggően csökkentette a *D*-szerin felvételét az SH-SY5Y sejtekbe (11. ábra).

Más *L*-aminosavakkal és ASCT szubsztrátokkal összevetve az *L*-teanin hatásereősége lényegesen alacsonyabbnak bizonyult. A *D*-szerin felvétel gátlásával egyidejűleg az intracelluláris *L*-teanin-szint koncentrációfüggő növekedése volt megfigyelhető, amely a neuroblasztóma sejtek *L*-teanin felvételére utalt. A gátlási kinetika további vizsgálata Lineweaver-Burk analízis segítségével megerősítette, hogy az *L*-teanin kompetitív módon gátolja a neuroblasztóma sejtek *D*-szerin felvételét.



11. ábra. Az *L*-teanin hatása az SH-SY5Y neuroblasztóma sejtek *D*-szerin felvételére. 25 μ M *D*-szerin felvételét 15 perc elteltével mértük különböző koncentrációjú (0-20 mM) *L*-teanin jelenlétében. Minden adatpontot az *L*-teanin hiányában mért *D*-szerin felvételével normalizáltunk, és a gátlás nélküli felvétel százalékában ábrázoltunk. Minden adatpont a *D*-szerin felvétel értékek átlagát (\pm S.E.M.) mutatja, százalékban kifejezve ($n = 3$). (1)

5. Következtetések

Bár számos gyógyszer képes lehet befolyásolni a glutamáterg neurotranszmissziót, azonban hatásmechanizmusuk gyakran nem feltárt, amely korlátozza alkalmazhatóságukat számos, a glutamát jelátvitellel összefüggő betegség kezelésében. A farmakológiai hatásukban részt vevő folyamatok feltárása új terápiás lehetőségeket nyithat, lehetővé téve alkalmazásukat új indikációkban. Doktori munkám során a tolperizon neuropátiás fájdalomra gyakorolt hatását vizsgáltam. A tolperizon egy centrális izomrelaxáns, amely képes lehet befolyásolni a glutamáterg neurotranszmissziót neuropátiás kórképekben, amelyben a fokozott glutamát-jelátvitel központi szerepet játszik. Emellett vizsgáltuk az *L*-teanin hatását központi idegrendszeri sejtek transzportmechanizmusaira is. Irodalmi adatok alapján ez a glutamát-analóg, amely a zöld tea egyik fő, aktív hatóanyaga magyarázhatja a tea levelek pro-kognitív hatásait. Az említett transzportfolyamatok szabályozzák mind a glutamát, mind a *D*-szerin szintjét a központi idegrendszerben, segítve az NMDAR aktivitást, ezáltal javítva a kognitív képességeket.

A tolperizon képes csökkenteni az allodíniát, amely arra utal, hogy ígéretes gyógyszer lehet a neuropátiás fájdalom kezelésében. Antiallodíniás hatása összehasonlítható mértékű volt a pregabalinéval,

amely egy, a neuropátiás fájdalom terápiájában alkalmazott, elsővonalbeli gyógyszer. Fájdalomcsillapító hatását valószínűleg a preszinaptikus idegvégződések glutamát felszabadulásának gátlásával éri el, így csökkentve a gerincvelői nociceptív jelátvitelt.

A tolperizon a feszültségfüggő nátriumcsatornák potens gátlószereinek bizonyult, amely magyarázhatja antiallodinikus hatását. Szintén megfigyelhető volt a tolperizon gátlóhatása a feszültségfüggő kalciumcsatornákra, bár csak lényegesen magas koncentrációk mellett, amelyek meghaladják a gyógyszer normál dózistartományát, így a kalciumcsatornák gátlása valószínűleg kevésbé járul hozzá fájdalomcsillapító hatásához. Az adrenerg alfa2-receptorokra gyakorolt hatása kísérleteinkben elhanyagolhatónak bizonyult.

Kísérleteink során az *L*-teanin az EAAT glutamát-, és az ASCT *D*-szerin transzporterek gyenge gátlószereinek bizonyult. Felvételük gátlásával az *L*-teanin növelheti az NMDAR koagonisták szinaptikus koncentrációját, így fokozva a glutamát-jelátvitelt. Ezen mechanizmusok additív hatása, valamint az egyéb, irodalmi adatok alapján felmerült célpontokra gyakorolt hatása együttesen magyarázatot adhat az *L*-teanin ismert pro-kognitív tulajdonságaira.

6. Saját publikációk jegyzéke

Közlemények az értekezés témájában:

1. Lakatos PP, Vincze I, Nyariki N, Bagaméry F, Tábi T, Szökő É. (2020) The Effect of L-Theanine and S-Ketamine on D-Serine Cellular Uptake. *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics*, 1868(10):140473. ; IF: 4.125
2. Lakatos PP, Karádi DÁ, Galambos AR, Essmat N, Király K, Laufer R, Geda O, Zádori ZS, Tábi T, Al-Khrasani M, Szökő É. (2022) The Acute Antiallodynic Effect of Tolperisone In Rat Neuropathic Pain and Evaluation of Its Mechanism of Action. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17).; IF: 6.208

Egyéb közlemények:

1. Vincze I, Lakatos PP, Bagaméry F, Tábi T, Szökő É. (2020) Characterization of a Cell Line Model for D-Serine Uptake. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 187:113360. ; IF: 3.571
2. Mohammadzadeh A, Lakatos PP, Balogh M, Zádor F, Karádi DÁ, Zádori ZS, Király K, Galambos AR, Barsi S, Riba P, Benyhe S, Köles L, Tábi T, Szökő É, Harsing Jr LG, Al-Khrasani M. (2021) *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5). ; IF: 6.208
3. Geda O, Tábi T, Lakatos PP, Szökő É. (2022) Differential Ganglioside and Cholesterol Depletion by Various Cyclodextrin Derivatives and Their Effect on Synaptosomal Glutamate Release. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16). ; IF: 6.208
4. Karádi DÁ, Galambos AR, Lakatos PP, Apenberg J, Abbood SK, Balogh M, et al. (2023) Telmisartan Is a Promising Agent for Managing Neuropathic Pain and Delaying Opioid Analgesic Tolerance in Rats. *Int J Mol Sci*.24(9).; IF: 6.208