

# Na poti od bazične znanosti do morebitnega novega zdravila

Pet let po odmevni znanstveni objavi v Nature Medicine so raziskovalci Inštituta za fiziologijo na Medicinski fakulteti Univerze v Mariboru svojo raziskavo nadgradili z novimi podatki, ki podpirajo klinični potencial kemijsko modificiranega dekstrometorfana (DXM) kot morebitnega novega zdravila proti sladkorni bolezni. O izzivih razvoja potencialnega novega zdravila smo se pogovarjali z izr. prof. dr. Andražem Stožerjem, soavtorjem raziskave in predstojnikom omenjenega inštituta.



Asist. VILJEM POHOREC, doc. dr. MAŠA SKELIN KLEMEN, izr. prof. dr. ANDRAŽ STOŽER in doc. dr. JURIJ DOLENŠEK

Optimizacija komplementarnih raziskovalnih metod je skupino profesorja Andraža Stožerja postavila v svetovni vrh raziskovanja pankreasnih betacelic.

V junijski številki revije Cell Chemical Biology so naši raziskovalci skupaj z raziskovalno skupino profesorja Eckharda Lammerta iz Düsseldorfa objavili obsežno raziskavo, ki potrjuje terapevtski potencial načrtno kemijsko modificirane molekule DXM. Raziskava iz leta 2015 je namreč pokazala terapevtski potencial, vendar je imel dekstrometorfan specifične neželenе učinke, ki so posledica njegovega centralnega delovanja. Zaradi zmanjšane možnosti prehoda prek hemato-

encefalne bariere pa nova molekula (Lam39) nima neželenih centralnih učinkov. Kot pojasnjuje Andraž Stožer, je DXM pokazal zanimiv farmakološki učinek, ki ob selektivnem, z glukozo spodbujenem izločanju inzulina izkazuje še dodaten ugoden učinek na preživetje betacelic in hkrati ne povzroča hipoglikemij.

#### V Mariboru izmerili 25- do 33-odstotno podaljšanje hitrih oscilacij betacelic

Raziskovalci iz Düsseldorfa so v mi-

nulih letih sintetizirali prek 100 različnih dekstrometorfanskih derivatov, s čimer so želeli – ob ohranjenem delovanju na pankreasne betacelice – osnovni molekuli otežiti prehod skozi hematoencefalno bariero. S kemijsko modifikacijo so povečali njeno velikost in polarnost, najboljše rezultate pa so pokazali trije izbrani derivati DXM, poimenovani Lam28, Lam38 in Lam39. Ob odsotnosti centralnih učinkov so omenjeni derivati na izoliranih Langerhansovih otočjih

# i avila

pokazali najvišjo stopnjo stimulacije izločanja inzulina, za nadaljnje raziskave pa so na koncu izbrali molekulo Lam39. Gre za morfinan, pri katerem so na osnovno aromatsko strukturo vezali imidazolski obroč, s čimer so ohranili njegove aktivnosti na glutamatnih receptorjih NMDA, hkrati pa je molekula dovolj velika, da skoraj ne prehaja hematoencefalne bariere. Po identifikaciji Lam39 so raziskavo prevzeli mariborski raziskovalci, ki so mehanizem delovanja izbrane učinkovine proučevali z metodami elektrofiziologije in optofiziologije.

#### Kako oceniti antiapoptozni učinek presnovka DXM?

Kot je pojasnil Stožer, so pri dekstrametorfanu ugotovili še dodaten izjemno zanimiv učinek – izkazalo se je namreč, da ugodno vpliva na preživetje betacelic. Kako morfinan, ki je pravzaprav »bratranec« morfija, deluje protivnetno, antiapoptozno in zaščitno na endotelij, raziskovalci še ne razumejo. Pri vrednotenju stopnje ohranitve preživetja betacelic se za zdaj zanašajo predvsem na metode *ex vivo*, se pa hitro razvija izjemno pomembno raziskovalno področje za opazovanje funkcionalne mase betacelic *in vivo*. Na področju metode prikazovanja *in vivo* potekajo številni projekti, v okviru katerih skušajo različne agoniste na specifičnih betaceličnih receptorjih opremiti z dodatnimi skupinami (označevalci), ki omogočajo spremljanje celic ob preiskavi z magnetno resonanco ali pozitronsko emisijsko tomografijo (PET).

»Nova tehnologija (magneti 5+ tesel) že omogoča stopnjo ločljivosti, ki bo v bližnji prihodnosti zelo verjetno ponudila tudi opazovanje Langerhansovih otočkov *in vivo*. Pričakujemo in upamo, da se bodo metodam za ocenjevanje funkcionalne aktivnosti betacelic čez kakšnih 10 let morda pridružile tudi diagnostične metode, ki bodo omogočale morfološko spremljanje mase aktivnih betacelic,« je povedal Stožer in pojasnil, da bodo metode prikazovanja *in vivo* gotovo koristne tudi pri raziskavah mehanizmov, ki povečajo preživetje betacelic. Pri tem je treba poudariti, da povezuje med maso in delovanjem betacelic ni zmeraj enoznačna. Zato bo treba še naprej izvajati tudi teste delovanja betacelic za oceno tako imenovane funkcionalne mase celic.



JURE MAKOVEC

Naš del raziskave smo izvajali dve leti, proučili smo, kako zaviranje receptorjev NMDA vpliva na depolarizacijo celic in dvig koncentracije znotrajceličnega kalcija, kar je glavni stimulus za izločanje inzulina. V betacelicah to teče v nekakšnih izbruhih aktivnosti, ki jim rečemo hitre oscilacije – vsaka traja nekaj sekund – in izkaže se, da z zaviranjem receptorjev NMDA podaljšamo trajanje posameznega izbruha. Ugotovili smo, da to podaljšanje v primeru Lam39 znaša kakšnih 25 do 33 odstotkov, kar je zagotovo eden od mehanizmov (ne nujno edini), ki so odgovorni za povečano izločanje inzulina.

Izr. prof. dr. **ANDRAŽ STOŽER**

»Dokler ne pridemo do končnih odgovorov, lahko verjamemo, da so ljudje nekoč jemali droge tudi zaradi učinkov, ki so presegali zgolj njihovo psihotropno delovanje«, je še dodal.

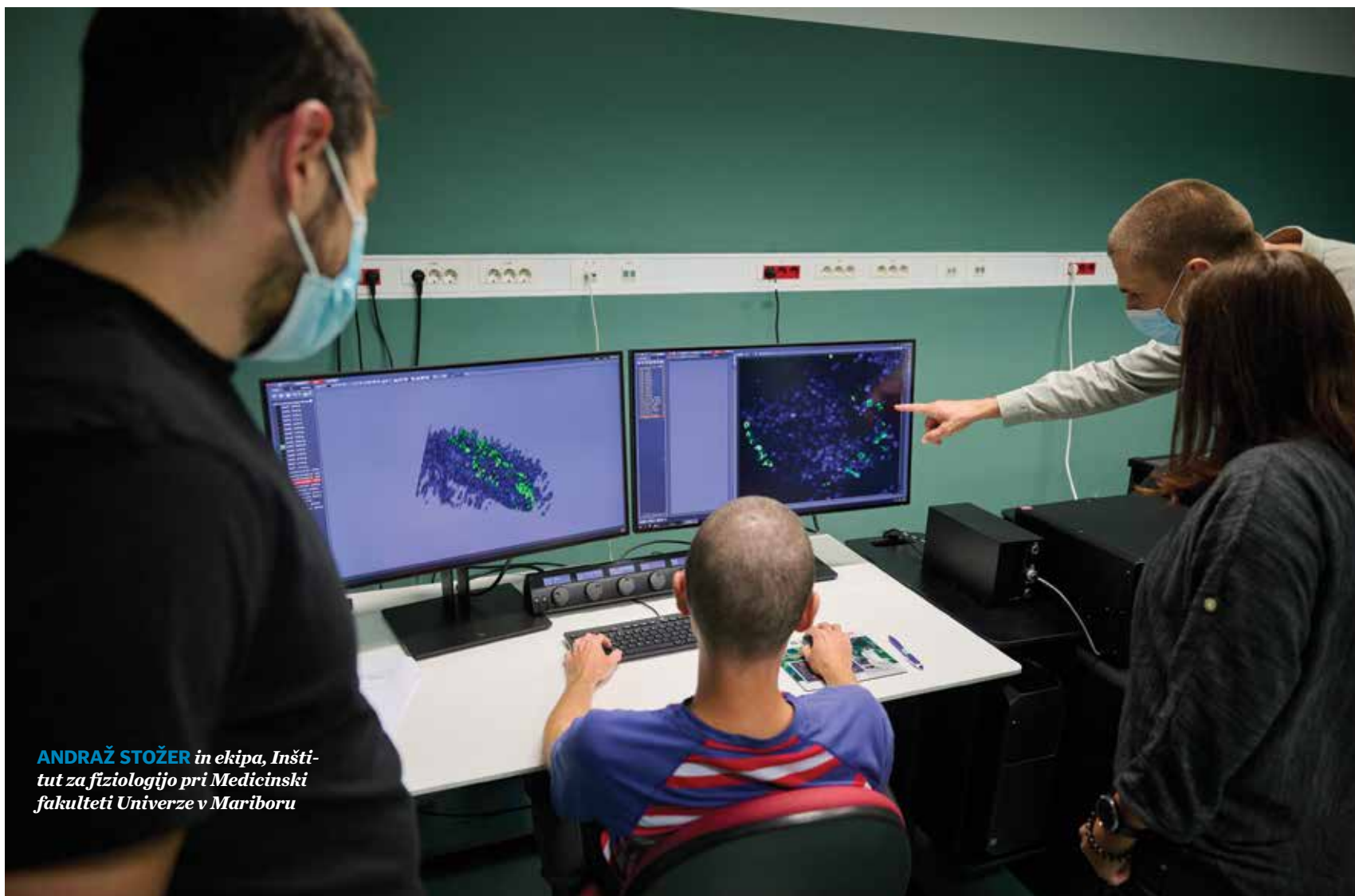
#### V svetovni vrh z inovativno kombinacijo raziskovalnih metod

Raziskovalno skupino profesorja Andraža Stožerja so po odličnih mednarodnih povezavah ustanovitelja inštituta in nekdanjega predstojnika prof. dr. Marjana Slaka Rupnika do sodelovanja v vrhunskih projektih pripeljale predvsem inovativne metodološke prednosti pri proučevanju pankreasih celic. Začelo se je pred skoraj dvema desetletjema z metodo tkivne rezine, ki jo je med službovanjem na Evropskem inštitutu za nevroznanost v Göttingenu razvil profesor Slak Rupnik, pozneje pa so jo »posvojili« številni laboratoriji. Danes lahko na inštitutu v Mariboru s pomočjo kombinacije elektrofiziološke metode vpete krpice membrane (angl. patch-clamp) z izjemno časovno

ločljivostjo merijo spremembe membranskih potencialov betacelic. Signal celice v njenem normalnem tkivnem kontekstu, torej nepoškodovano in povezano z drugimi celicami, lahko zajamejo s frekvenco 10 kilohercov, kar pomeni, da lahko teoretično zaznajo podaljšanje trajanja celičnega izbruha za zgolj eno desetinko tisočinke sekunde.

To priča o izjemni časovni občutljivosti metode, katere pomanjkljivost pa je povezana z dejstvom, da lahko meritev opravijo le pri eni celici. Širši pogled na dogajanje v celotni inzulinski funkcionalni enoti so mariborski raziskovalci dosegli z razvojem še ene inovativne raziskovalne metode, ki je bila središče doktorskega raziskovalnega dela Andraža Stožerja. Gre za metodo prikazovanja kalcija (angl. Ca-imaginga), ki omogoča hkratno merjenje oscilacij kalcija v več 100 celicah določenega Langerhansovega otočka. V letih po objavi odmevnega članka v reviji *Nature Medicine* so z večjo tehnično spretnostjo in novimi barvili





**ANDRAŽ STOŽER** in ekipa, *Inštitut za fiziologijo pri Medicinski fakulteti Univerze v Mariboru*

- > občutljivost metode izjemno izboljšali; od frekvence en herc so prešli na rutinsko snemanje kalcijevih oscilacij s frekvenco vsaj 10 hercev (10-krat v sekundi).

### Dejavniki uspeha

Inovativna kombinacija treh raziskovalnih metod je raziskovalni skupini profesorja Stožerja omogočila celosten pristop k raziskovanju aktivnosti pankreasnih betacelic, ki je enkrat v svetu. Kar zadeva metodo prikazovanja kalcija, v njihovem laboratoriju že dosegajo snemanje oscilacij kalcija s frekvenco tudi do 200 hercev, kar so trenutno sposobni edini na svetu. Na vprašanje o tem, kako jim je to uspelo, Stožer odgovarja: »Takšni rezultati so povezani z nekaj ključnimi dejavniki. Seveda ne moremo mimo odličnih infrastrukturnih razmer, ki jih v našem laboratoriju omogočata predvsem dva konfokalna mikroskopa – naj kot zanimivost povem, da bomo čez dva tedna montirali še tretjega, ki bo prvi takšen mikroskop na svetu. Poleg infrastrukture seveda poudarjam znanje in motiviranost, ki je v naši skupini na zelo visoki ravni in – kot tretje – zagon raziskav je omogočila inovativna metoda tkivne rezine, ki so jo v dveh desetletjih po odkritju posvojili številni drugi laboratoriji. Njena ključna prednost je v tem, da so celice žive, brez mehanskih in encimskih poškodb, v intaktnem okolju pa so sposobne dolgega preživetja. Zadnji dejavnik našega uspeha je povezan s tehnološkim razvojem, ki je na področju Ca-imaginga povezan predvsem z boljšimi kalcijevimi barvili – ta namreč danes omogočajo hitrejšo odzivanje barvila na dejanske spremembe koncentracije znotraj-celičnega kalcija.«

**Mag. Samo Pitamic**  
md@medicina-danes.si

## Paradoks receptorjev NMDA

Zanimiv paradoks je povezan z dejstvom, da so receptorji NMDA pravzaprav kalcijevi kanalčki; seveda se lahko vprašamo, kako potem z antagonistom NMDA izboljšamo izločanje inzulina. Z antagonistom kalcijevih kanalčkov, kot je dekstrometorfan, torej izboljšamo kalcijev signal. Rešitev paradoksa leži v dejstvu, da pride glavna kalcija v celico po čisto drugih poteh (ne po NMDA, ampak po drugih od napetosti odvisnih kalcijevih kanalčkih). Kot kaže, pravi Stožer, delujejo receptorji NMDA kot nekakšna zavora, ki ob nakopičenju kalcija znotraj celice z dodatno lokalno sprostitvijo prehoda kalcija v celico aktivirajo lokalni kalijev kanal (ki je od kalcija odvisen). Ko iz celice v večji meri izhaja kalij, to celico hiperpolarizira in tako ustavi ali zavre vnos kalcija po glavni poti. Z zaviranjem receptorja NMDA ta zavorni mehanizem ustavimo, zaradi česar se trajanje oscilacij podaljša.

## Obeti za novo antidiabetično zdravilo

Izbrano modificirano dekstrometorfansko molekulo Lam39 bodo preizkusili v kliničnem programu, ki bo verjetno – ker gre za povsem novo molekulo – zahtevala predhodno testiranje učinkovine na živalskih modelih. Pozitivni rezultati obetajo razvoj nove farmakološke učinkovine oziroma zdravila za zdravljenje bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 2. Nemški raziskovalci so pred petimi leti že zastavili klinično raziskavo, kjer so preizkušali učinkovitost in varnost dekstrometorfana, in sicer skupaj z zaviralcem DPP-4 sitagliptinom (Lammert, 2016).

Viri:

Marquard J, s sod. *Characterization of pancreatic NMDA receptors as possible drug targets for diabetes treatment. Nature Medicine. 2015.*

Scholz O, s sod. *Peripherally active dextrometorphan derivatives lower blood glucose levels by targeting pancreatic islets. Cell Chemical Biology. 2021.*

Šterk M, s sod. *NMDA receptor inhibition increases, synchronizes, and stabilizes the collective pancreatic beta cell activity: Insights through multilayer network analysis. PLOS Comp Biology. 2021.*