

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Óvári Ignác

***Az ex vivo bal és jobb pitvar,*  
mint a receptorműködés általános vizsgálatára  
különösen alkalmas kísérleti rendszerek**

DEBRECENI EGYETEM  
TÁPLÁLKOZÁS- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA  
DEBRECEN, 2024.

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Az *ex vivo* bal és jobb pitvar,  
mint a receptorműködés általános vizsgálatára  
különösen alkalmas kísérleti rendszerek**

Dr. Óvári Ignác

TÉMAVEZETŐ: Dr. Gesztelyi Rudolf



DEBRECENI EGYETEM  
TÁPLÁLKOZÁS- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA  
DEBRECEN, 2024.

*It is a capital mistake to theorize before one has data. Insensibly one begins to twist facts to suit theories, instead of theories to suit facts.*

*Sir Arthur Conan Doyle*

# Tartalomjegyzék

<b>1. Fontosabb rövidítések .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Irodalmi áttekintés .....</b>	<b>2</b>
2.1. Epidemiológiai háttérinformációk .....	2
2.2. A purinerg jelátvitel.....	3
2.3. Az adenzin keletkezése, transzportja és receptorai .....	4
2.4. Az A <sub>1</sub> adenzin receptor és ligandjai .....	6
2.5. A pitvari myocardium.....	8
2.6. A Hill egyenlet .....	9
2.7. A receptorális válaszkészség módszer (RRM) .....	10
2.8. Célkitűzéseim .....	14
<b>3. Anyagok és módszerek .....</b>	<b>15</b>
3.1. <i>Ex vivo</i> módszerek .....	15
3.1.1. <i>Vegyszerek és oldatok</i> .....	15
3.1.2. <i>Állatok és preparátumok</i> .....	15
3.1.3. <i>Kísérleti protokollok és csoportok</i> .....	16
3.1.4. <i>Koncentráció-hatás görbe kiértékelés</i> .....	17
3.2. <i>In silico</i> módszerek.....	18
3.2.1. <i>Elemzett adatok</i> .....	18
3.2.2. <i>Regressziós modellek</i> .....	19
3.3. Adatelemzés.....	22
<b>4. Eredmények .....</b>	<b>24</b>
4.1. <i>Ex vivo</i> eredmények.....	24
4.1.1. <i>A bal és jobb pitvari inotropia</i> .....	24
4.1.2. <i>A jobb pitvari chronotrop válasz</i> .....	25
4.2. <i>In silico</i> eredmények.....	27
4.2.1. <i>Az illesztett egyenletek formájának jelentősége</i> .....	27
4.2.2. <i>A modellek számának és használati módjának hatása</i> .....	30
4.2.3. <i>Az egyszerre illesztett torzult E/c görbék számának hatása</i> .....	31
<b>5. Megbeszélés .....</b>	<b>39</b>
5.1. <i>Ex vivo</i> következtetések.....	39
5.2. <i>In silico</i> következtetések.....	41
<b>6. Az új eredmények összefoglalása .....</b>	<b>48</b>
<b>7. Summary of the findings.....</b>	<b>49</b>
<b>8. Irodalom .....</b>	<b>50</b>
8.1. A disszertáció elkészítéséhez felhasznált irodalom.....	50
8.2. A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények .....	58
<b>9. Tárgyszavak .....</b>	<b>60</b>
<b>10. Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>61</b>
<b>11. Függelék – az RRM szoftverbe írható modelljei .....</b>	<b>62</b>
<b>12. Függelék – az értekezés alapjául szolgáló közlemények .....</b>	<b>64</b>

# 1. Fontosabb rövidítések

95% CI: 95%-os konfidencia intervallum

A<sub>1</sub> receptor: A<sub>1</sub> adenosin receptor

Ado: adenosin

ADP: adenosin-difoszfát

AMP: adenosin-monofoszfát

ATP: (adenosin-5'-trifoszfát)

cAMP: ciklikus adenosin-monofoszfát

CHA: N<sup>6</sup>-cyclohexyladenosine

CPA: N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine

CPX: 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine

E/c: koncentráció-hatás

HT: hipoxantin-triciklánó

Krebs oldat: módosított Krebs-Henseleit puffer

M: mol/l

NECA: 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine

RRM: receptoriális válaszkészség módszer (receptorial responsiveness method)

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. Epidemiológiai háttérinformációk

A jó életminőség szempontjából elengedhetetlen a cardiovascularis rendszer egészségének és jó funkciójának megőrzése. Ennek hiányában megnövekszik az esélye a magasvérnyomás kialakulásának, annak minden következményével (pl. stroke és szívinfarktus). A legalacsonyabb jövedelmű országokban jelenleg is a fertőző betegségek felelősek a legtöbb halálesetért, ezzel szemben a közepes és magas jövedelemmel bíró országokban a cardiovascularis betegségek jelentik a leggyakoribb halálokat. Magyarországon is évek óta a szív- és érrendszeri betegségek csoportja, azon belül is az ischaemiás szívbetegség képviseli a legnagyobb problémát (1. ábra) (Timmis és mtsai, 2021; WHO.).



1. ábra. A leggyakoribb halálokok Magyarországon (a WHO – a disszertáció írásakor – legfrissebb adatai alapján) (WHO, 2024)

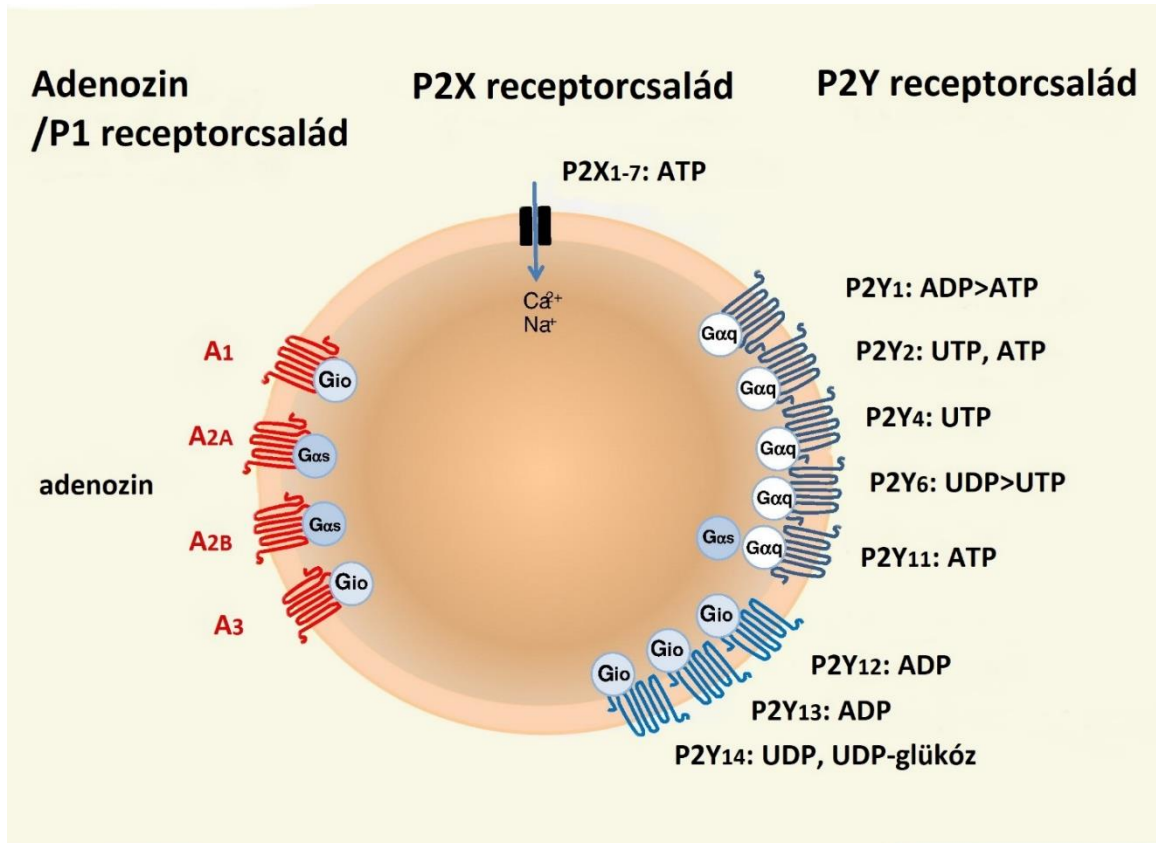
Az érintett betegek életkilátásai és életminősége egészségtudatosabb életvitellel javíthatók, tehát a magas életszínvonal nem feltétlenül jelent magas cardiovascularis kockázatot. További kezelési lépcsőként (a betegség súlyosabb formáinál) következik a gyógyszeres kezelés. A meglévő gyógyszerkincs bővítésének fő módja új vegyületek szintézise, de hasznos a már forgalomban lévő farmakonok esetleges cardiovascularis hatásainak feltárása is. A szív- és érrendszeri betegségek szempontjából kiemelt jelentőségű molekula az adenzin, amely képes belső védő mechanizmusokat aktiválni. Gyakran kiindulási vegyületként használják új farmakonok fejlesztésénél, melyek alkalmasak lehetnek bizonyos cardiovascularis betegségek kezelésére (Headrick és mtsai, 2011).

## 2.2. A purinerg jelátvitel

A purinerg transzmisszióban résztvevő receptorok két nagy csoportja a P1 (avagy adenzin receptorok) és a P2 (Jacobson és mtsai, 2011). A P1 család endogén ligandja az adenzin, négy (al)típusa az A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> és A<sub>3</sub>. Az adenzin receptorok mindegyike G fehérje kapcsolt és hét transzmembrán doménnal rendelkezik (Fredholm és mtsai, 2001, 2011; IJerman és mtsai, 2022). A P2 csoport két receptoreszaládot tartalmaz, a P2X (ionotrop) és P2Y (metabotrop) receptorokat, melyeket számos nukleotid és ezek foszfátjai képesek aktiválni. A P2X családon belül hét receptortípus van (P2X<sub>1</sub>-P2X<sub>7</sub>), melyek homotrimer vagy heterotrimer, ATP-kapuzott ioncsatorna receptorok. A P2Y családba nyolc típus tartozik, melyek mind G fehérje kapcsoltak. A P1 és P2 receptorok között metabolikus kapcsolatot jelent, hogy utóbbiak endogén agonistáit ektonukleotidázok nukleozidokká, köztük adenzinná hidrolizálják (2. ábra) (Burnstock, 1996; Boeynaems és mtsai, 2005).

A purinerg receptorok a legtöbb szövettípusban megtalálhatóak és széleskörű szabályozási feladatokat látnak el a legkülönbözőbb területeken, mint például gyulladás, immunválasz, sejtszaporodás, szekréció, apoptózis, vazoreguláció. A purinerg rendszer jelátviteli sajátosságai számos cardiovascularis betegségben megváltoznak, ilyen a hipertensio, az atherosclerosis vagy az ischaemiás szívbetegség. Mindezek kóros érpermeabilitáshoz és vascularis remodellinghez vezetnek. Potenciális kedvező hatásaik miatt több purinerg gyógyszerjelöltet vizsgálnak újabb és újabb indikációs területek lefedésére (Burnstock, 2002; Di Virgilio és Vuerich, 2015; Ralevic, 2021).

Kiemelkedő célpontnak számítanak az adenzin receptorok, melyek cardiomyocytákon, endotélsejteken és vascularis simaizomsejteken egyaránt kifejeződnek és többféle protektív hatást mediálnak és (Reiss és mtsai, 2019).



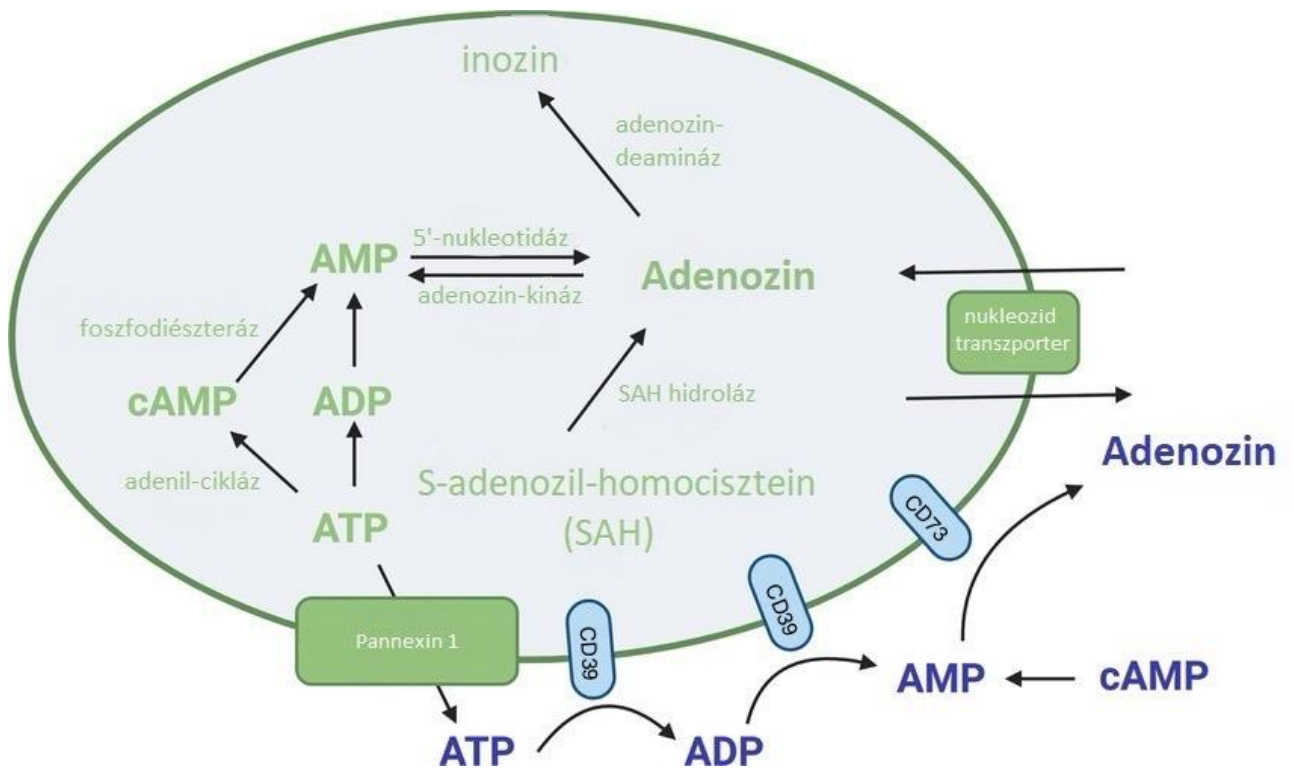
2. ábra. A purinerg jelátvitel receptorai és endogén ligandjai.  $G_{i0}$ : gátló G-fehérje,  $G_{as}$ ,  $G_{aq}$ : aktiváló G-fehérjék (Ralevic és Dunn, 2015)

### 2.3. Az adenzin keletkezése, transzportja és receptorai

Az adenzin két részből, egy adenin purin-bázisból és egy ribóz monoszacharidból felépülő purin nukleozid. Mivel az ATP (adenozin-5'-trifoszfát) metabolitja is, megkerülhetetlen résztvevője a szervezet energiaforgalmának. Az ATP nélkülözhetetlen a nagy energiaigényű folyamatokhoz, mint például a sejtek mozgása, az aktív transzportok többsége vagy az ingerlékeny sejtek membránpotenciálja. A szabad adenzin mennyisége tehát fontos indikátora a szervezet energetikai állapotának, az adenzin koncentráció növekedése ugyanis a sejtek kimerülésére utal. Fiziológias körülmények között is folytonosan képződik, de csak kis mennyiségben. Mindezek magyarázzák, hogy az adenzin

egy saját receptorcsalád endogén agonistája (Porkka-Heiskanen és Kalinchuk, 2011; Camici és mtsai, 2018).

Adenozin keletkezik az intra- és az extracelluláris oldalon is, elsősorban ATP, ADP, AMP és cAMP bontása révén, melyet a sejten belül endo-5'-nukleotidázok (és más alkalikus foszfatázok), a sejteken kívül pedig ekto-5'-nukleotidázok katalizálnak. Felszabadulhat még intracelluláris raktárából, az S-adenozil-homociszteintől (SAH) is. Extracelluláris képződésében fő szerepet visz a CD39 (ATP → ADP → AMP) és a CD73 (AMP → adenozin) (3. ábra) (Fredholm és mtsai, 2001, 2011; IJerman és mtsai, 2022; Porkka-Heiskanen és Kalinchuk, 2003; Antonioli és mtsai, 2013; Yegutkin és Boison, 2022).



3. ábra. Az adenozin keletkezése és metabolizmusa (Zhang és mtsai, 2021)

Az intra- és az extracelluláris adenozin koncentráció egyensúlyát aktív és passzív nukleozid transzporterek biztosítják. Az aktív transzportban a sejt belsejébe szállító  $\text{Na}^+$ -függő koncentratív CNT1, CNT2 és CNT3 vesznek részt. A passzív, kétirányú transzportért az ekvilibratív ENT1, ENT2 és ENT3 felelősek (Molina-Arcas és mtsai, 2009; Pastor-Anglada és Pérez-Torras, 2018). A nukleozid transzporterek nagy kapacitásúak és aktivitásúak, legfontosabb szubsztrátjuk pedig az adenozin. Ennek következtében az

adenozin féléletideje a legtöbb szövetben igen rövid, csupán 0,6-10 másodperc, fiziológias koncentrációja pedig alacsony (a humán plazmában 0,1-1  $\mu\text{M}$ ) (Gessi és mtsai, 2011; Kazemzadeh-Narbat és mtsai, 2015; Antonioli és mtsai, 2023).

Emlős myocardiumban jellemzően az ENT1 fejeződik ki leginkább. Ebből adódik, hogy a cardiomyocytákban főleg az extracelluláris és intracelluláris adenzin-szint különbsége határozza meg a nukleozid transzport irányát, mely utóbbi fiziológiásan a sejtbe irányul (Ramadan és mtsai, 2014; Ruan és mtsai, 2023).

Az adenzin receptorcsalád  $A_1$  és  $A_3$  típusa  $G_i$  és  $G_o$  protein kapcsolattal rendelkezik, ami a sejtben adenilát-cikláz gátlást okoz. Az  $A_2$  típus viszont  $G_s$  proteinhez kapcsolódik, ami adenilát-cikláz aktivációhoz vezet. Mindemellett az  $A_{2B}$  altípus számos sejtben  $G_q$ -fehérje révén foszfolipáz C-t aktivál, melynek következtében intracellulárisan kalcium szabadul fel (Fredholm és mtsai, 2001, 2011; IJerman és mtsai, 2022; Borea és mtsai, 2018; Burnstock, 2020; Yang és mtsai, 2021; Mahmood és Iqbal, 2022).

## 2.4. Az $A_1$ adenzin receptor és ligandjai

Az adenzin  $A_1$  típusú receptorán ( $A_1$  receptor) keresztül számos protektív hatást mediál, melyeknek a szíven részét képezik a negatív trop (inotrop, chronotrop, dromotrop és bathmotrop) hatások. A klinikumban az adenzin elsősorban antiarrhythmias szerként szerepel, de gyors eliminációja miatt (biztonságossága ellenére) nem alkalmazzák széleskörűen. A szintetikus  $A_1$  receptor agonisták közös jellemzője, hogy az adenzinnál biológiailag stabilabb vegyületek, vagyis rosszabb szubsztátjai az adenzin metabolizmus enzimeinek és ennek köszönhetően hosszabb felezési idejük. A gyógyszerjelöltként kipróbált szintetikus  $A_1$  receptor agonistáktól azt várják, hogy az adenzin által kiváltható protektív és regeneratív folyamatokat erőteljesebben indítsák el, miközben mellékhatásaik maradjanak jól kezelhető szinten. A különböző  $A_1$  receptor agonisták fejlesztése jelentős potenciált hordoz (talán túlságosan is) széleskörű terápiás lehetőségeivel, például antiischaemiás, antiarrhythmias, fájdalomcsillapító, antidiabetikus, neuroprotektív, gyulladáscsökkentő, antifibrotikus, immunomoduláns, antiproliferatív és antivirális szerként (Guieu és mtsai, 2021; Batra és mtsai, 2021; Kutryb-Zajac és mtsai, 2023; Perfilova és mtsai, 2023; Vincenzi és mtsai, 2023; Jacobson és mtsai, 2019, 2023). További közös vonásuk, hogy koncentráció-hatás (E/c) görbéik az adenzinéhoz képest jellemzően balra toltak

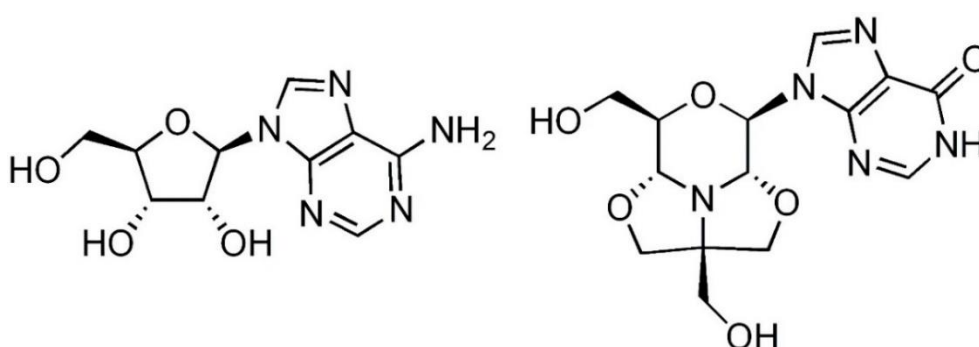
(lassúbb eliminációjuk miatt) és így használatukkal megbízhatóbb adatokat lehet kapni az A<sub>1</sub> receptor működéséről (Gesztelyi és mtsai 2003).

Az A<sub>1</sub> receptor antagonisták legrégebben alkalmazott csoportja a xantinszármazékok. Ezek közül a metil-xantin szerkezetű koffein és teofillin a legismertebbek, melyek természetes, reverzibilis, kompetitív, nem szelektív antagonisták (Chang és mtsai, 2004). Régóta ismertek fáradságűző, teljesítményfokozó és hörgőtágító hatásaikról. Terápiás céllal csak a teofillint (és komplexét, az aminofillint) alkalmazzák, mint hörgőtágítót, mivel A<sub>1</sub> receptor antagonistaként a szívre kifejtett pozitív trop hatásaik hosszútávon több kárt okoznak, mint hasznot. Emellett „piszkos” szerek, vagyis más támadáspontokkal is rendelkeznek: nem szelektív foszfodiészteráz inhibitorok és ryanodin receptor agonisták is (Daly és mtsai, 1986; Fredholm és mtsai, 2001), melyek következményei főleg nagy koncentrációban való alkalmazás során kerülnek előtérbe (Fredholm és mtsai, 2017).

Kísérleteink során több, biológiailag stabil /tehát élő szövetekben az adenzinénál (<10 s) jóval nagyobb felezési idejű/ adenzin analógot használtunk. A CPX (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine) a teofillinhez hasonló szerkezetű, de szelektív A<sub>1</sub> receptor antagonista. Kötődése reverzibilis és ortosztatikus, így kompetitív antagonista (Auchampach és mtsai, 2004). A CPA (N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine) szelektív és teljes (full) A<sub>1</sub> receptor agonista. Ez az analóg purinvázis és hosszú felezési idejű, továbbá gyakran kiindulási vegyülete a cardiovascularis terápiás céllal fejlesztett A<sub>1</sub> receptor agonistáknak (Fredholm és mtsai, 2001). Nagyon hasonló hozzá CHA (N<sup>6</sup>-cyclohexyladenosine), ami szintén szelektív és (majdnem) teljes agonista, viszont kiemelkedően ellenáll az enzimatis bontásnak (igen nagy felezési idejű). Használtunk még NECA-t (5'-(N-ethylcarboxamido)adenosine) is, ami a CPA-tól és a CHA-tól eltérően nem az adenin molekularészen tartalmaz módosítást, hanem a ribóz részen. Ennek megfelelően a NECA nem szelektív az A<sub>1</sub> receptorra, kb. ugyanannyira stimulálja az A<sub>2</sub> receptort is (teljes agonistaként), az A<sub>3</sub> receptor működését viszont csak alig befolyásolja. A NECA emellett ugyanakkor a CPA-hoz hasonlóan nagy felezési idejű vegyület, noha nem olyan mértékben, mint a gyakorlatilag (vagyis kísérleteink időablakában) nem metabolizálódó CHA (Holmgren és mtsai, 1986; Fredholm és mtsai, 2001; Pavan és IJzerman, 1998). (Az agonisták teljes illetve parciális voltára vonatkozó megállapítások természetesen – az ún. „intrinsic efficacy”, vagyis a kötődés utáni hatáskiváltó képesség relatív meghatározása miatt – a tudomány aktuális állásától függenek. Mindig az aktuálisan legerősebb agonisták tekintendők teljes agonistának, míg a náluk gyengébbek parciálisnak.

Mihelyt kifejlesztenek egy még erősebb agonistát, az addigi tejes agonisták parciálissá minősítettnek át.)

Egyik vizsgálatunk középpontjában a hipoxantin-triciklánó (HT) állt, melyet a Gyógyszerészi Kémia Tanszéken (Debreceni Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar) szintetizáltak. A HT az adenzin szerkezeti analógja, amiben adenin helyett hipoxantin, míg ribóz helyett egy morfolínó alapú, kondenzált triciklusos molekula van (4. ábra). A molekulát eredetileg antivirális szerként vizsgálták, cardiovascularis hatásai korábban ismeretlenek voltak (Kicsak, 2018; Kicsak és mtsai, 2018).



4. ábra. Az adenzin (balra) és hipoxantin-triciklánó (jobbra) szerkezete (Kicsak, 2018; Kicsak és mtsai, 2018)

## 2.5. A pitvari myocardium

A szívizom anatómiai és funkcionális szempontból két részre osztható: a supraventricularis (pitvari) és a kamrai myocardiumra. A pitvari myocardiumon az adenzin, akárcsak az acetilkolin, lényegesen erősebb negatív trop hatásokat képes kiváltani, mint a kamrai szívizmon (Kurachi és mtsai, 1986; Belardinelli és mtsai, 1995). Ennek háttérében az  $A_1$  típusú adenzin receptorok és az  $M_2$  altípusú muszkarinos acetilkolin receptorok nagyobb sűrűsége és gazdagabb posztreceptorális jelátvittele áll (Caulfield és Birdsall, 1998; Fredholm és mtsai, 2001, 2011; Peyronnet és Ravens, 2019). Az  $A_1$  receptor és az  $M_2$  receptor negatív trop hatásai két fő szignalizációs útvonalon keresztül érvényesülnek: a muszkarin által aktiválható (muscarinic-operated)  $K^+$  csatorna nyitása és az adenilcikláz gátlása. A muszkarin-aktivált  $K^+$  csatorna az ún. GIRK (G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels) tagja, ami döntően a pitvari myocardiumban található

(kamrán csak elvétele), az adenilcikláz enzim ugyanakkor a legtöbb szövetben előfordul, így a szívizomban is (Belardinelli és mtsai, 1995; Shryock és Belardinelli, 1997; Fredholm és mtsai, 2001, 2011; Peyronnet és Ravens, 2019).

Az  $A_1$  receptor stimulációja a kamrai szívizomban a nyugalmi szintig redukálja az adenilcikláz működését, ezáltal a kontrakciós erő is a nyugalmi értékre áll vissza (ezt indirekt negatív inotrop hatásnak nevezik). A pitvari myocardiumban azonban az  $A_1$  receptor aktivációja a nyugalmi szint alá tudja vinni az inotrop funkciót (amit direkt negatív inotrop hatásnak hívnak). Ez utóbbi jelenséget általában a muszkarin-aktivált  $K^+$  csatorna működésének tulajdonítják (Kurachi és mtsai, 1986; Belardinelli és mtsai, 1995). A jelen értekezés alapjául szolgáló vizsgálataink során az adenilcikláz enzimet előzetesen sosem stimuláltuk, tehát mindig az  $A_1$  receptor direkt negatív inotrop működését detektáltuk.

Ez a kísérleti elrendezés azért előnyös, mert az  $A_1$  receptor a nyugalmi kontraktilitás és chronotropia csökkentésével az izolált pitvari myocardiumon jól reprodukálható és – általában – kiemelkedően kis szórású, tehát megbízható adatok gyűjtésére nyújt lehetőséget. Az izolált, ingerelt bal pitvar különösen alkalmas megbízható adatok generálására, hiszen ez a preparátum – akut módon – nem is nagyon képes mással reagálni az őt ért behatásokra (pl. az  $A_1$  receptor felől), mint kontrakciós erejének változtatásával. Ez a kísérleti elrendezés tehát alkalmas olyan vizsgálatok kivitelezésére is, ahol a pontatlanságra érzékeny kvantitatív elemzésre, például regresszióanalízisre (görbeillesztésre) sor kerül (Karsai és mtsai, 2006; Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014, 2015; Erdei és mtsai, 2018; Szabó és mtsai, 2019a).

A jelen értekezést megalapozó két vizsgálatunk mindegyike ilyen kísérleti rendszerben készült. *Ex vivo* vizsgálatunk során az inotrop és a chronotrop hatásokat is mértük, ekkor az adatok pontosságának abban volt jelentősége, hogy kis hatásokat is tudjunk differenciálni. *In silico* vizsgálatunkban ugyanakkor regresszióanalízist végeztünk, ezért ide olyan pontosságú és megbízhatóságú adatok kellettek, amelyeket az izolált, ingerelt bal pitvar tud biztosítani.

## 2.6. A Hill egyenlet

A Hill egyenlet volt az első teljesen kvantitatív, tehát egzakt receptorműködési modell, melyet ma is használnak ligandkötési és E/c görbék adatainak kiértékeléséhez, de szinte minden kvantitatív (illetve szemikvantitatív) receptorműködési modellnek is az alapja

(Prinz, 2010; Gesztelyi és mtsai, 2012; Buchwald, 2017, 2019). A Hill egyenlet klasszikus alakja:

$$E = E_{max} \cdot \frac{c^n}{c^n + EC_{50}^n}$$

1. egyenlet

ahol: c: az E/c görbe előállításához alkalmazott agonista koncentrációja; E: a kiváltott hatás;  $E_{max}$ : a maximális hatás;  $EC_{50}$ : az  $E_{max}$  felét kiváltó („félhatásos”) agonista koncentráció; n: az E/c görbe középpontbeli meredekségét jellemző tényező (Hill-féle koefficiens). Az 1. egyenlet tehát a vizsgált E/c görbék három paraméterrel jellemzi:  $E_{max}$ ,  $EC_{50}$  és n.

Gyakorlati szempontból az x tengelyen a koncentráció logaritmusát érdemes felvenni. Általában a koncentráció jellegű adatoknak a logaritmusa normális eloszlású, így logaritmikus formában a statisztikai elemzés könnyebben és pontosabban végezhető el. A logaritmus széthúzza a kis koncentrációk tartományát és összenyomja a nagy koncentrációk tartományát, ezért az így készült ábrák egyben szemléletesebbek is (a  $\log EC_{50}$  értékhez tartozó hatás érték például a E/c görbe középpontjába kerül). A Hill egyenlettel készített függvények logaritmikus x és lineáris y tengely mellett jellegzetes szigmoid lefutásúak lesznek.

A Hill egyenlettel végzett regresszióanalízis kétváltozós ( $\log c$ , E) és háromparaméteres ( $E_{max}$ ,  $\log EC_{50}$ , n). A Hill egyenlet előnye, hogy nagy mérési vagy a biológiai variabilitásból eredő hibával terhelt y adatok mellett is jó becslések végezhetőek vele. A Hill egyenlet szimmetrikus E/c görbét feltételez, mely az esetek többségében jó közelítéssel meg is valósul. Ebből adódóan paraméterei empirikusak, tehát más mérésekkel nem erősíthetők meg, illetve más mérésekből származó állandók nem illeszthetők bele (Giraldo és mtsai, 2002; Gesztelyi és mtsai, 2012).

## 2.7. A receptorális válaszkészség módszer (RRM)

A biológiai mintákban található kis és közepes méretű molekulák koncentrációjának meghatározása általában analitikai probléma, amelyet az általános vélekedés szerint napjainkban már megbízhatóan meg lehet oldani. Azonban jelenleg is nehezen kivitelezhető

olyan kis és közepes molekulák koncentrációjának meghatározása, melyek rövid felezési idővel rendelkeznek és működő, esetlegesen mozgó szövetekben találhatóak. Bizonyos feltételek mellett a receptorális válaszkészség módszer (receptorial responsiveness method: RRM) megoldást nyújthat erre a problémára, ugyanis az RRM segítségével megbecsülhető farmakológiai agonisták koncentrációjának növekedése a receptoraik mikro környezetében (Gesztelyi és mtsai, 2004; Karsai és mtsai, 2006).

Az RRM bonyolultságát interdiszciplináris jellege adja, de valójában egyszerű elven alapuló módszer. A könnyebb megértés érdekében gondoljunk bele, hogy ugyanabba a biológiai rendszerbe kétszer egymás után ugyanazt az agonista dózist adjuk be. A két dózis hatásának korrekt kiszámításához először is ugyanazt a kiindulási állapotot kell alapul venni, még hozzá az első dózis beadása előtti állapotot. Emellett a második dózis hatásának meghatározásakor az első dózist is figyelembe kell venni. Ha nem így járunk el, akkor a második dózis által kiváltott hatást kisebbnek fogjuk találni, mint az első dózisét.

Ennek a látszólagos hatáscsökkenésnek az áll a háttérében, hogy az első dózis molekulái a receptorok egy részéhez kötődve hatást váltanak ki, így a rendszer válaszkapacitásának egy részét elhasználják. Emiatt a második dózis már egy csökkent válaszkapacitású rendszerben fog hatni. Ha például az első dózis elég nagy ahhoz, hogy maximális hatást váltson ki, akkor a további dózisok már nem is tudnak további választ kiváltani. A látszólagos válaszkészség ily módon kialakuló csökkenése az első (tehát a figyelmen kívül hagyott) dózis nagyságától függ. Ez a látszólagos válaszcsökkenés lehetőséget ad az adott agonista elsőként beadott (vagy létrejött) koncentrációjának számszerűsítésére, amennyiben az ismeretlen. Az elsőként beadott agonistát, mivel az (figyelmen kívül hagyása miatt) torzítja a másodjára beadott agonistára kiszámolt választ, „torzító agonistának”, koncentrációját pedig „torzító koncentrációnak” nevezzük (Gesztelyi és mtsai, 2004; Karsai és mtsai, 2006, 2007; Greczer és mtsai, 2010a, 2010b).

Ki kell emelni, hogy ez a jelenség nem a receptorok deszenzitizációján alapul, mely utóbbi egyenesen zavarja az előbbieken leírt jelenséget. Az RRM becslése ugyanis csak akkor megbízható, ha az adott receptor lassan deszenzitizálódik a meghatározás időtartama alatt. Mivel az A<sub>1</sub> receptor különösen lassan veszíti el a natív válaszkészségét (Mundell és Kelly, 2011), megfelelő tárgya az RRM-mel kivitelezett vizsgálatoknak.

Az RRM-mel akkor is végezhető koncentráció becslés, ha a két egymás után alkalmazott (vagyis a figyelmen kívül hagyott és a figyelembe vett) dózis két különböző agonistához tartozik, amennyiben azok ugyanazt a hatást váltják ki. Tehát még az sem

szükséges, hogy ugyanazon receptor agonistái legyenek, az is elegendő, ha van legalább egy olyan jelátviteli út, amit ugyanabba az irányba befolyásolnak (és ez jól mérhető) (Gesztelyi és mtsai, 2004). Fontos azonban, hogy az RRM által szolgáltatott becslés, melyet  $c_x$ -nek jelölünk, mindig arra az agonistára vonatkozik, amit másodjára adtunk be. Ha tehát a két (a figyelmen kívül hagyott és a figyelembe vett dózishoz tartozó) agonista azonos, a  $c_x$  egyenlő a torzító koncentrációval (pontosabban közvetlenül azt becsli). Ha viszont nem, a  $c_x$  a másodjára beadott (és figyelembe vett) agonista azon koncentrációját adja meg, ami ugyanakkora hatást képes kiváltani, mint az először beadott (de figyelmen kívül hagyott) agonista, vagyis a  $c_x$  nem feltétlen egyenlő, de (a várakozás szerint) ekvieffektív a torzító koncentrációval (Gesztelyi és mtsai, 2004; Karsai és mtsai, 2006, 2007; Greczer és mtsai, 2010a, 2010b).

A legmegbízhatóbb becslést azok az E/c görbék (koncentráció-hatás párok) biztosítják az RRM számára, amelyek teljesek (vagyis még hatástalan agonista koncentrációval kezdődnek és további hatásnövekedést kiváltani már nem tudóval fejeződnek be). Az RRM kivitelezéséhez kétféle E/c görbére van szükség. Az egyik konvencionálisan felvett, „intakt” E/c görbe, ami az agonista koncentrációk és a hozzájuk tartozó hatások natív biológiai környezetben való kapcsolatáról hordoz információt. A másik „torzult” E/c görbe, amit a torzító koncentráció hatásának kifejlődése után kell felvenni és így a torzulás mértékéről tájékoztat. Ugyanabban a rendszerben több torzító koncentráció meghatározásához természetesen több torzult E/c görbe szükséges (egy intakt E/c görbe plusz annyi torzult, ahány torzító koncentrációt akarunk meghatározni) (Gesztelyi és mtsai, 2004).

Az RRM alapegyenlete, ami a módszer elméleti lényegét képezi:

$$E' = 100 - \frac{100 \cdot (100 - E)}{100 - E_x}$$

2. egyenlet

ahol:  $E'$ : a torzult hatás, amit úgy számoltunk ki, mintha csak a torzult E/c görbe előállításához alkalmazott agonista adott koncentrációja ( $c$ ) hozta volna létre, nem pedig a  $c$  és a torzító koncentráció együtt;  $E$ : az intakt (vagyis torzulásmentes) hatás, ami tehát mind a  $c$ , mind a torzító koncentráció jelenlétét figyelembe veszi;  $E_x$ : a torzító koncentráció intakt (korrekten kiszámolt) hatása.

Az RRM leggyakoribb felhasználása a torzult E/c görbék regresszióanalízise, amihez az intakt E/c görbére is szükség van. Az RRM görbeillesztésre szolgáló modelljében ezért

két egyenlet ötvöződik: az RRM alapegyenlete, ami megadja az intakt hatás és a hozzá tartozó torzult hatás közötti kapcsolatot, valamint egy kvantitatív receptorműködési modell, ami a legtöbb esetben (így a jelen disszertációt megalapozó vizsgálatokban is) a Hill egyenlet. A receptorműködés Hill modellje kellően pontos (noha nem a legpontosabb), miközben kellően egyszerű (bár nem a legegyszerűbb) (Gesztelyi és mtsai, 2012). Az RRM modelljének eredetileg közölt („klasszikus”) alakja (Gesztelyi és mtsai, 2004):

$$E' = 100 - \frac{100 \cdot \left( 100 - E_{max} \cdot \frac{(c_x + c)^n}{(c_x + c)^n + EC_{50}^n} \right)}{100 - E_{max} \cdot \frac{c_x^n}{c_x^n + EC_{50}^n}}$$

3. egyenlet

ahol:  $c$ : a torzult E/c görbe előállítására alkalmazott agonista koncentrációja;  $E'$ : a torzult hatás (ld. 2. egyenlet);  $E_{max}$ ,  $EC_{50}$  és  $n$ : a torzult E/c görbéhez tartozó intakt E/c görbét jellemző Hill paraméterek (ld. 1. egyenlet);  $c_x$ : a torzult E/c görbe előállításához alkalmazott agonista koncentrációja, ami (a várakozás szerint) ekvieffektív a torzító koncentrációval. Mivel a jelen értekezést megalapozó vizsgálatok során a torzító (figyelmen kívül hagyott) és a torzult E/c görbe előállításához alkalmazott (figyelembe vett) agonista végig azonos volt, a  $c_x$  a továbbiakban mindig közvetlenül a torzító koncentrációt becsli.

Az intakt E/c görbe információit két fő módon lehet felhasználni. Az egyik lehetőség az ún. lokális (vagy individuális) regresszió. Ennek során először az adott receptorműködési modellt az intakt E/c görbére illesztjük, majd a regressziós paramétereire kapott értékeket behelyettesítjük az RRM modelljébe (vagy az RRM modelljében ezeket a paramétereket a kapott értékeken rögzítjük). Ezután az RRM modelljét a torzult E/c görbére illesztve megkaphatjuk az egyetlen variábilisan maradt paraméter,  $c_x$  (vagy  $\log c_x$ , ld. később) értékét (Gesztelyi és mtsai, 2004; Greczer és mtsai, 2010a).

A másik fő lehetőség a globális regresszió, amikor is az intakt és a torzult E/c görbéket egyszerre illesztjük. Ez maga is kétféleképpen kivitelezhető. Egymodelles globális regresszió esetén az intakt és a torzult E/c görbékre egyetlen modellt illesztünk, ami az RRM modellje (természetesen ezúttal variábilis receptorműködési modell paraméterekkel). Kétmodelles globális regresszió esetében viszont az intakt E/c görbére csak a receptorműködési modellt illesztjük, a torzult E/c görbére csak az RRM modelljét, miközben megosztjuk közöttük a receptorműködési modell paramétereit (amelyek tehát itt is variábilisak voltak) (Curve Fitting Guide, 2024).

Összefoglalva, az RRM modellel végzett regresszióanalízis kétváltozós ( $\log c_x$ ,  $E'$ ), négyparaméteres ( $E_{\max}$ ,  $\log EC_{50}$ ,  $n$ ,  $c_x$  vagy  $\log c_x$ ) és nemlineáris. Ha a Hill-féle paramétereket állandó értéken rögzítjük, az RRM modell illesztése egyparáméteresé ( $c_x$  vagy  $\log c_x$ ) válik.

## 2.8. Célkitűzéseim

A HT *ex vivo* vizsgálatoknál a cél annak feltárása volt, hogy a molekula hatással van-e a pitvari kontraktilitásra és chronotrop működésre, továbbá esetleges hatásait az  $A_1$  receptorhoz kötődve fejti-e ki.

Az RRM *in silico* vizsgálata során az egyik cél az volt, hogy megvizsgáljuk, az RRM modell ( $c_x$ -szel való osztással járó) egyszerűsítésével javíthatók-e a kapott eredmények. A következő cél annak feltárása volt, hogy az RRM modelljében a  $c_x$  vagy a  $\log c_x$  alkalmazása-e a célravezetőbb. További kérdésként felvetettük, hogy a  $c_x$  illetve a  $\log c_x$  paraméter individuális, egymodelles globális vagy kétmodelles globális regresszióval ad-e pontosabb illetve megbízhatóbb eredményt, valamint hogy melyik eljárás használható kényelmesebben. Célul tűztük ki annak tisztázását is, hogy az E/c görbecsaládok (egy intakt E/c görbe plusz több hozzá tartozó torzult E/c görbe) esetében az összes görbére egyszerre történő illesztés-e a jobb, vagy a páronkénti (egy intakt E/c görbe plusz egy torzult E/c görbe) illesztés. Mindemellett megvizsgáltuk, miként befolyásolja az RRM eredményeit, ha tekintettel vagyunk az E/c görbe adatok szórásának eloszlására is.

## 3. Anyagok és módszerek

### 3.1. *Ex vivo* módszerek

#### 3.1.1. *Vegyszerek és oldatok*

Vizsgálataink során a következő vegyszerek alkalmaztuk: hipoxantin-triciklánó (HT: adenozin analóg), melyet a Debreceni Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszerészi Kémia Tanszéken állítottak elő; valamint adenozin (nem szelektív, reverzibilis adenozin receptor agonista) és CPX (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine; reverzibilis, szelektív A<sub>1</sub> adenozin receptor antagonist), amiket a Sigma-tól (St. Louis, MO, USA) szereztünk be.

A szervkádak feltöltésére, továbbá az adenozin és a HT törzsoldatok hígítására 36 °C-os, módosított Krebs-Henseleit puffert (Krebs oldat) használtunk. Ez utóbbi összetétele: NaCl: 118 mM, KCl: 4,7 mM, CaCl<sub>2</sub>: 2,5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1 mM, MgCl<sub>2</sub>: 1,2 mM, NaHCO<sub>3</sub>: 24,9 mM, glükóz: 11,5 mM, aszkorbinsav: 0,1 mM. A CPX oldószere dimetil-szulfoxid (DMSO) volt. Minden törzsoldat 10 mM-os koncentrációban készült.

#### 3.1.2. *Állatok és preparátumok*

Kísérleteinkhez hím Wistar patkányokat használtunk fel, melyek testtömege 400-500 g volt. Az állatok tartása, feldolgozása, illetve a protokollok kivitelezése megfelelt a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottságának Etikai Kódexe által támasztott követelményeknek és az Európai Unió előírásainak (etikai engedélyek: 25/2013 DEMÁB és 5/2020 DEMÁB).

A patkányok fejét guillotine-nal levágtuk. Az elülső mellkasfalat eltávolítottuk, a szívet a csúcánál fogva megemeltük, kivágtuk és 4-5 °C-os Krebs oldatba helyeztük, amit előtte karbogénnel (95% O<sub>2</sub> és 5% CO<sub>2</sub> elegye) 10 percen keresztül buborékolattunk. A szív leállítását követően elsőként a bal pitvar fülcséjét vágtuk le (a továbbiakban: bal pitvar). Ezután következett a maradék supraventricularis szövet (a bal pitvar fülcsén kívüli része és a teljes jobb pitvar) levágása, melyről óvatosan eltávolítottuk a nagyerek maradványait (a továbbiakban: jobb pitvar).

A pitvarokat 10 ml-es, karbogénnel szellőztetett Krebs oldattal töltött, vertikális állású szervkádakban (TSZ-04, Experimetria, Budapest) rögzítettük (36 °C, pH 7,4). A fülcsék csúcsát fonállal a teflon szervtartó alsó részéhez kötöttük, majd a szervtartót a szervkádba tettük. Végül a fülcsé azon pontját, amely a legtávolabb esett az auricula rögzített csúcsi részétől, fonállal egy transzducer (SD-01, Experimetria, Budapest) karjához rögzítettük.

A felkötést követően a bal pitvarokat platinaelektrodon keresztül ingereltük (pontoszerűen) programozható stimulátorral (ST-02, Experimetria, Budapest) és erősítővel (PST-02, Experimetria, Budapest) (3 Hz frekvencián, 1 ms impulzusszélességgel és 1-1,5 V feszültséggel). A jobb pitvarok esetén külön ingerlésre nem volt szükség, mivel spontán működtek.

A pitvarok kontrakciós erejét az izometriás összehúzódások amplitúdójával jellemeztük, melyet a transzducer alakított elektromos jellé, jelerősítő (SG-01D, Experimetria, Budapest) növelt, majd hőérzékeny papírra rögzítő hőírókaros poligráf (R-61 6CH, Medicor, Budapest) alakított vissza távolsággá.

A pitvarokat 10 mN nyugalmi feszülésre állítottuk be, melyet – szükség esetén – minden mosási időszak végén visszaállítottunk.

### *3.1.3. Kísérleti protokollok és csoportok*

A pitvarok felkötését követően először 45 perces inkubációs időszak kezdődött Krebs oldatban. Ezután felvettük az első kumulatív (az egyes beadások mosás nélkül követték egymást) E/c görbét adozin emelkedő koncentrációival („Ado görbe”), ezután a Krebs oldat néhány percenkénti cseréjével 15 percig mostuk a preparátumokat. Innentől a két protokollt (P1, P2) különböző módon folytattuk.

A P1 protokoll (n=14) során ezt követően kumulatív E/c görbét generáltunk HT-val („HT görbe”), majd a HT kimosása nélkül adozinnal is felvettünk egy kumulatív E/c görbét („Ado+HT görbe”).

A P2 protokoll (n=10) során viszont a szervkádakba 10  $\mu$ M CPX-et mértünk be, azután 10 perc múlva (mosás nélkül) egy második adozin E/c görbét generáltunk („Ado+CPX görbe”). Ezt követően 10 percig mostunk Krebs oldattal, amelyet 10 perc újabb

inkubáció követett 10  $\mu\text{M}$  CPX-szel. Végül egy kumulatív E/c görbe következett HT alkalmazásával („HT+CPX görbe”) (1. táblázat).

	Első inkubáció	Első E/c görbe	Második inkubáció	Második E/c görbe	Harmadik inkubáció	Harmadik E/c görbe
<b>P1</b>	Krebs oldat 45 perc	adenozin (1 nM- 1 mM); „Ado görbe”	Krebs oldat 15 perc	hipoxantin-triciklánó (1 nM - 300 $\mu\text{M}$ ); „HT görbe”	-	adenozin (1 nM- 1 mM); „Ado+HT görbe”
<b>P2</b>			Krebs oldat 15 perc; 10 $\mu\text{M}$ CPX 10 perc	adenozin (1 nM- 1 mM); „Ado+CPX görbe”	Krebs oldat 10 perc; 10 $\mu\text{M}$ CPX 10 perc	hipoxantin-triciklánó (1 nM - 300 $\mu\text{M}$ ); „HT+CPX görbe”

1. táblázat. *Ex vivo* vizsgálatunk két protokollja (P1, P2). Ado: adenozin; HT: hipoxantin-triciklánó; CPX: 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine; E/c: koncentráció-hatás

### 3.1.4. Koncentráció-hatás görbe kiértékelés

Az inotropia meghatározásához először a regisztrált összehúzódások amplitúdóját (egészen precízen: az összehúzódások alsó és a felső burkológörbéjének távolságát) mértük le a megfelelő (ld. lentebb) helyeken. A kontrakciós erő változását a kiindulási értékhez viszonyítottuk és százalékos formában fejeztük ki:

$$E_i = \frac{F - F_0}{F_0} \times 100\%$$

4. egyenlet

$E_i$ : az inotrop hatás;  $F$ : a kontrakciós erő, melyet az adott farmakon dózis beadása után mértünk;  $F_0$ : a kiindulási kontrakciós erő. Negatív inotrop hatás során az adott dózis szervkádba juttatása után meghatározott legkisebb kontrakciós erőt használtuk fel a kiértékelés további részében, míg pozitív inotropia esetén az adott dózis beadása utáni legnagyobb kontrakciós erőt használtuk.

A chronotropia meghatározásakor elsőként a „pulzusszámot” (HR) számítottuk ki:

$$HR = 8,82 \frac{\text{mm}}{\text{s}} \times \frac{x}{50 \text{ mm}} \times 60 \frac{\text{s}}{\text{min}}$$

5. egyenlet

8,82 mm/s: a regisztrálópapír sebessége;  $x$ : az összehúzódások száma a regisztrátumon, egy 50 mm-es szakaszon.

Negatív chronotrop hatás esetén az adott agonista dózis beadása utáni legkisebb frekvenciát mutató 50 mm-es regisztrátum szakaszt vettük figyelembe, míg pozitív chronotrop hatás esetében a legnagyobb frekvenciáját. A chronotrop hatás ( $E_c$ ) kiszámításához a kiindulási pulzusszámot ( $HR_0$ ) és a farmakon adott koncentrációja jelenlétében kialakuló pulzusszámot ( $HR$ ) használtuk fel. A pulzusszám változását a kiindulási értékhez viszonyítottuk és százalékos formában fejeztük ki:

$$E_c = \frac{HR - HR_0}{HR_0} \times 100\%$$

6. egyenlet

## 3.2. *In silico* módszerek

### 3.2.1. Elemzett adatok

Az *in silico* vizsgálatunkban elemzett E/c görbék (melyeket tengerimalacból izolált, ingerelt bal pitvaron vettek fel) a munkacsoport két korábbi *ex vivo* vizsgálatából származtak (Gesztelyi és mtsai, 2004; Szabó és mtsai, 2019a). Az egyik esetben E/c görbepárokról volt szó, vagyis mindegyik intakt E/c görbéhez egyetlen torzult E/c görbe tartozott (Szabó és mtsai, 2019a). A másik esetben E/c görbecsaládok voltak, melyeknél egy intakt E/c görbéhez egynél több torzult E/c görbe tartozott (Gesztelyi és mtsai, 2004). Az E/c görbéket az RRM-mel újraértékeljük oly módon, hogy a különböző regressziós lehetőségeket kombináltunk és kerestük közülük a legpontosabbat, a legprecízebbet és a legkönnyebben használhatót.

Az intakt – torzult E/c görbepárok (Szabó és mtsai, 2019a) újraértékelésekor a következő lehetőségeket kombináltuk:

- az RRM modelljének  $c_x$ -et (9. és 10. egyenlet, ld. később) illetve  $\log c_x$ -et (11. egyenlet, ld. később) tartalmazó formáját;
- az RRM  $c_x$ -et tartalmazó modelljét egyszerűbb (10. egyenlet, ld. később) illetve bonyolultabb (9. egyenlet, ld. később) formájában;
- az RRM individuális, egymodelles globális illetve kétmodelles globális illesztését;
- a regresszió hagyományos illetve robusztus módját.

Az intakt – torzult E/c görbecsaládok (Gesztelyi és mtsai, 2004) újraértékelésekor már figyelembe vettük az előbbi vizsgálat tapasztalatait, ezért ekkor a következő lehetőségeket kombináltuk (minden esetben a 11. egyenletet használva, ld. később):

- az RRM individuális, egy- illetve kétmodelles globális illesztését;
- a regresszió hagyományos illetve robusztus módját;
- az illesztést az E/c görbecsalád összes tagjára egyszerre illetve páronként (az intakt E/c görbét egyszerre csak egy torzult E/c görbével).

Az intakt E/c görbékét stabil (hosszú felezési idejű), szintetikus A<sub>1</sub> receptor agonistákkal (CPA, NECA vagy CHA) vettük fel úgy, hogy az E/c görbe felvételét nem előzte meg adenzin receptor agonista használata. A torzult E/c görbék esetében is az előbbi agonistákat használtunk, de nem sokkal az E/c görbe felvétele előtt a későbbiekben használt agonista egy ismert dózist juttattunk a szervkádba (az E/c görbék felvétele azután kezdődött, hogy az extra agonista koncentráció hatása teljesen kifejlődött). A kiértékelés során figyelmen kívül hagytuk az agonista elsőként beadott koncentrációját (és annak hatását), így az torzító koncentrációvá vált.

Az intakt – torzult E/c görbepárok (Szabó és mtsai, 2019a) torzító koncentrációja az adott agonista EC<sub>50</sub>-éhez közeli érték volt. Az intakt – torzult E/c görbecsaládok (Gesztelyi és mtsai, 2004) E/c három torzító koncentrációja két nagyságrendre terjedt ki (a középső torzító koncentráció közel volt az alkalmazott agonista EC<sub>50</sub> értékéhez).

### 3.2.2. Regressziós modellek

Az intakt E/c görbék jellemzésére a Hill egyenlet görbeillesztésre optimalizált formáját használtuk. Ebben a klasszikus formát egy c<sup>n</sup>-nel végzett osztással egyszerűsítettünk, továbbá a benne szereplő koncentrációkat logaritmusként fejeztük ki (c → 10<sup>log c</sup>, EC<sub>50</sub> → 10<sup>log EC<sub>50</sub></sup>) (Gesztelyi és mtsai, 2012):

$$E = \left\{ E_{max} \cdot \frac{c^n}{c^n + EC_{50}^n} = \frac{E_{max}}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{c}\right)^n} = \frac{E_{max}}{1 + 10^{n \cdot (\log EC_{50} - \log c)}} \right.$$

7. egyenlet

Az RRM modellt klasszikus alakján kívül (ld. 3. egyenlet) sok, algebrailag egyenértékű formában ki lehet fejezni. Ezek közül a további vizsgálatok szempontjából a következő négy érdemel figyelmet:

$$E' = 100 - \frac{100 \cdot \left( 100 - \frac{E_{max}}{1 + \left( \frac{EC_{50}}{c_x + c} \right)^n} \right)}{100 - \frac{E_{max}}{1 + \left( \frac{EC_{50}}{c_x} \right)^n}}$$

8. egyenlet

$$E' = 100 - \frac{100 \cdot \left( 100 - E_{max} \cdot \frac{(c_x + 10^{\log c})^n}{(c_x + 10^{\log c})^n + 10^{n \cdot \log EC_{50}}} \right)}{100 - E_{max} \cdot \frac{c_x^n}{c_x^n + 10^{n \cdot \log EC_{50}}}}$$

9. egyenlet

$$E' = 100 - \frac{100 \cdot \left( 100 - \frac{E_{max}}{1 + 10^{n \cdot (\log EC_{50} - \log(c_x + 10^{\log c}))}} \right)}{100 - \frac{E_{max}}{1 + 10^{n \cdot (\log EC_{50} - \log(c_x))}}}$$

10. egyenlet

$$E' = 100 - \frac{100 \cdot \left( 100 - \frac{E_{max}}{1 + 10^{n \cdot (\log EC_{50} - \log(10^{\log c_x} + 10^{\log c}))}} \right)}{100 - \frac{E_{max}}{1 + 10^{n \cdot (\log EC_{50} - \log c_x)}}$$

11. egyenlet

A 8. egyenlet a 3. egyenletből származik két osztás révén: a számlálóban  $(c_x+c)^n$ -nel, a nevezőben  $c_x^n$ -nel. Utóbbi fontos következménye, hogy így  $c_x$  elvileg már nem vehet fel nulla értéket. A 9. egyenlet is a 3. egyenletből származik oly módon, hogy a  $c$ -t és az  $EC_{50}$ -et (vagyis az egyenletben szereplő két koncentrációt) logaritmikus formában fejeztük ki (mint  $10^{\log c}$  és  $10^{\log EC_{50}}$ ). Ez azt jelenti, hogy a 9. egyenletben a függvényként való illesztés során  $\log c$  (és nem  $c$ ) lesz a független változó, valamint  $\log EC_{50}$  lesz az egyik paraméter ( $EC_{50}$  helyett). A 10. és a 11. egyenletet egyaránt a 8. egyenletből képeztük a  $c$  és az  $EC_{50}$  logaritmikus formában való szerepeltetésével (vagyis bennük is  $\log c$  és  $\log EC_{50}$  lesz a független változó és az egyik paraméter, akár csak a 9. egyenletben). Köztük az a

különbség, hogy a 10. egyenletben a  $c_x$  maradt a torzító koncentráció meghatározására irányuló regressziós paraméter (mint a 3., 8. és 9. egyenletben), míg a 11. egyenletben a  $\log c_x$  lett regressziós paraméter (ami tehát a torzító koncentráció 10-es alapú logaritmusát becsli).

A jelen értekezést megalapozó *in silico* vizsgálatunk során a 9., 10. és 11. egyenletet illesztettük. Közülük a 9. és a 10. egyenlet  $c_x$ -et tartalmaz, tehát közvetlenül a torzító koncentrációt adja meg, míg a 11. egyenletben  $\log c_x$  van, így az a torzító koncentráció 10-es alapú logaritmusát adja meg. Fontos még, hogy a három közül egyedül a 9. egyenletben nincs  $c_x$ -el való osztás, tehát ez az RRM bonyolult formája, míg a másik kettő (10., 11.) az egyszerűsített. Szigorúan matematikai szempontból egyedül a 9. egyenlet adhat a  $c_x$ -re nulla értéket, a másik kettő csak ennél nagyobbat (2. táblázat) (ld. még 11. Függelék).

RRM modell	$c$ és $EC_{50}$	$c_x$ , $\log c$ és $\log EC_{50}$	$\log c_x$ , $\log c$ és $\log EC_{50}$
Bonyolult (nincs osztás $c_x$ -szel)	3. egyenlet	→ 9. egyenlet	
Egyszerűsített (osztás $c_x$ -szel)	8. egyenlet	→ 10. egyenlet	→ 11. egyenlet

2. táblázat. Az RRM algebrailag ekvivalens egyenletei, melyek közül a 9-11. egyenletet összehasonlító céllal görbeillesztésre használtunk. A 9. és 10. egyenlettel kapott eredmények összehasonlítása az illesztett egyenlet összetettségének hatását mutatja, valamint a  $c_x$ -el való osztás hatását. A 10. és 11. egyenlet összevetése a torzító koncentráció illesztett formájának ( $c_x$  vagy  $\log c_x$ ) hatásáról tájékoztat.  $c$  és  $\log c$ : az E/c görbe felvételekor bejuttatott agonista koncentrációja, illetve annak 10-es alapú logaritmusa (mint független változó);  $EC_{50}$  és  $\log EC_{50}$ : az E/c görbe készítéséhez használt agonista félhatásos koncentrációja, illetve annak 10-es alapú logaritmusa (mint paraméter);  $c_x$  és  $\log c_x$ : a torzító koncentráció, illetve annak 10-es alapú logaritmusa (mint kötelezően variábilis paraméter).

A 9-11. egyenleteket individuális, egymodelles globális illetve kétmodelles globális illesztéssel is használtuk mind az intakt, mind a torzult E/c görbék esetében.

Individuális regresszió során egyszerre egy (intakt vagy torzult) E/c görbére illesztettük a 9-11. egyenletek egyikét, melynek Hill paramétereit ( $E_{max}$ ,  $\log EC_{50}$  és  $n$ ) állandó értéken rögzítettük (ld. fentebb).

Globális regresszió során az összes paraméter ( $E_{max}$ ,  $\log EC_{50}$ ,  $n$  és  $c_x$  vagy  $\log c_x$ ) variábilis volt mindhárom egyenletben. Egymodelles globális illesztés során az összetartozó intakt és torzult E/c görbékre egyszerre illesztettük a 9-11. egyenletek egyikét. Kétmodelles globális regresszió esetén is egyszerre illesztettük az összetartozó intakt és torzult E/c görbéket, de az intakt E/c görbére a 7. egyenletet, míg a hozzá tartozó torzult E/c görbé(k)re a 9-11. egyenletek egyikét.

Abban az esetben, ha egynél több torzult E/c görbe tartozott egy intakt E/c görbéhez egy- illetve kétmodelles globális regresszió esetén, akkor két lehetőség is adódott. Az egyik esetben a görbeillesztést az összetartozó minden E/c görbére egyszerre végeztük el („mindet-egyszerre illesztés”). A másik esetben egyszerre csak két összetartozó E/c görbére illesztettünk, melyek közül az egyik mindig az intakt E/c görbe volt („páronkénti illesztés”).

Individuális és egymodelles globális regresszió során meghatároztuk  $\log c_x$  illetve  $c_x$  értékeket az intakt E/c görbékre is. Mivel ekkor a becslés várható értéke nulla volt, ez kontrollként szolgált a meghatározás során. A kétmodelles globális illesztés nem adott becslést az intakt E/c görbékre, mivel azokra csak a Hill modellt (7. egyenlet) illesztette.

Az illesztéseket elvégeztük hagyományos (ordinary least-squares) és robusztus módon is.

### 3.3. Adatelemzés

A statisztikai elemzést, a görbeillesztést és az ábrakészítést GraphPad Prism 8.4.2 (*ex vivo* rész) és 9.5.1 (*in silico* rész) szoftverrel végeztük (GraphPad Software Inc., La Jolla, California, USA). Néhány egyszerűbb szerkesztéshez és számításhoz a Microsoft Excel 365 programot használtuk (Microsoft Co., Redmond, WA, USA).

Ahhoz, hogy egy pitvar adatai bent maradjanak a feldolgozott adatok között, a pitvarnak három kritériumot kellett teljesítenie:

1. a legelső adenozin E/c görbe kiindulási kontrakciós ereje el kellett érje az 1 mN-t;
2. a kontrakcióknak szabályosaknak kellett lenniük (a bal és a jobb pitvarok esetében is);

3. a 10  $\mu\text{M}$  adenzinra adott válasz (az első adenzin E/c görbe esetében) belül kellett legyen a számtani közép  $\pm 2$  SD tartományon.

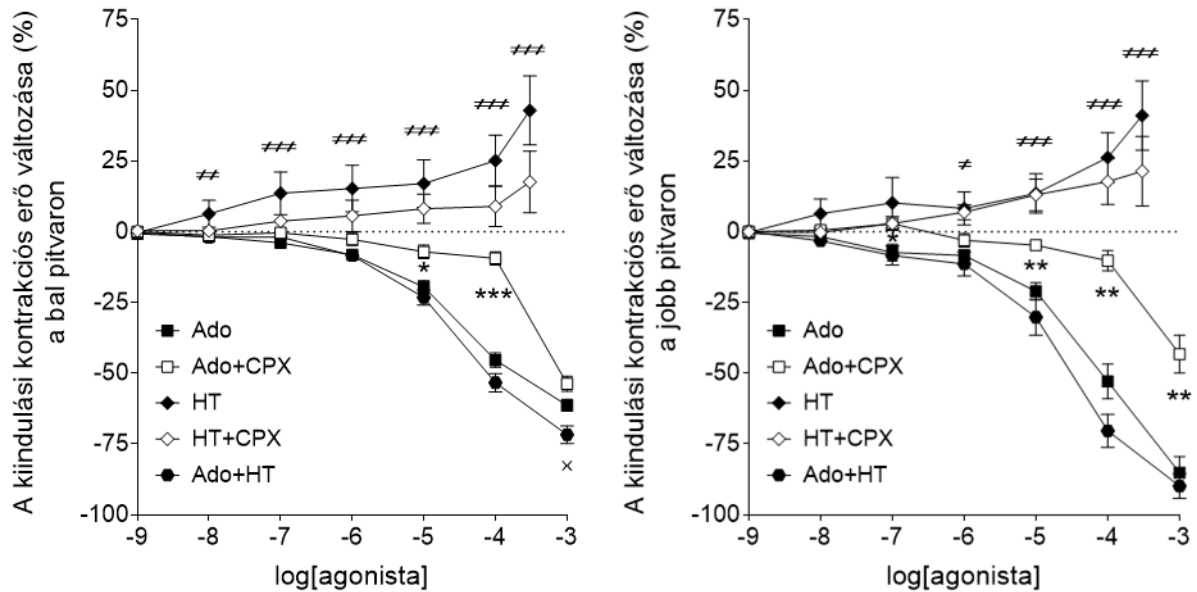
Az *ex vivo* adatok eloszlásának normalitását D'Agostino-Pearson és Shapiro-Wilk teszttel vizsgáltuk. Két, normális eloszlást mutató adathalmazt nem párosított t teszttel vetettünk össze egymással (ha az F teszt szignifikáns eltérést jelzett, Welch korrekció mellett). Két, nem normális eloszlású adathalmaz összehasonlításához Mann-Whitney U tesztet alkalmaztunk. Kettőnél több, Gauss-féle eloszlást mutató adathalmazt egyutas ANOVA-val és azt követő Tukey poszt-teszttel vetettünk össze. Kettőnél több, nem normális eloszlású adathalmazhoz Kruskal-Wallis tesztet és Dunn poszt-tesztet használtunk.

Az *in silico* vizsgálatban az RRM **pontosságát** („accuracy”) az ismert (általunk létrehozott) torzító koncentráció értékeknek és az RRM azokra adott becsléseinek ( $c_x$ ) különbsége mutatta.

Az RRM **precizitását** („precision”) a regresszió által közvetlenül szolgáltatott  $\log c_x$  illetve  $c_x$  értékek 95%-os konfidencia intervallumának szélességével jellemeztük. A görbeillesztés és az E/c görbe adatok precizitását a 95%-os megbízhatósági (konfidencia) és előrejelzési (predikciós) sávok szélessége jellemezte a regressziós függvény körül.

A 95%-os konfidencia intervallumok által nyújtott további információ a közvetlenül meghatározott  $\log c_x$  illetve  $c_x$  értékek ezeken belüli pozíciója volt. Ha a 95%-os konfidencia intervallum szimmetrikus (vagy ahhoz közeli) volt, akkor az illesztett modell parametrizációját megfelelőnek tekinthettük (Curve Fitting Guide, 2024).





5. ábra. Fent két eredeti regisztrátum látható, lent az adenosin és a HT által kiváltott inotrop hatást (átlag  $\pm$  SEM) mutató E/c görbék, melyeket a bal (bal panel) és a jobb (jobb panel) pitvarokon vettünk fel. A legfelső regisztrátum az adenosin hatására fokozatosan csökkenő pitvari kontrakciós erőt mutatja, míg az alatta levő regisztrátum a HT jelenlétében kezdetben kissé, aztán a végére látványosabban növekvő kontrakciós erőt. A hőérzékeny papíron a pitvari kontrakciókat mint egy idő-erő függvényt jeleníti meg, az egyedi rángások közel függőleges lefutásúak. Ezek a rángások egymással összefolynak, így vízszintes lefutású, változó színintenzitású kék csíkot képeznek. A kék szín intenzitása a hőírókar végének a papír adott pontján eltöltött idejével arányos, vagyis egyrészt a rángások nagysága, másrészt a papírfutási sebesség határozza meg (utóbbit többször változtattuk a regisztráció folyamán, hogy az egyes agonista koncentrációkra adott válaszok jól elkülönüljenek).

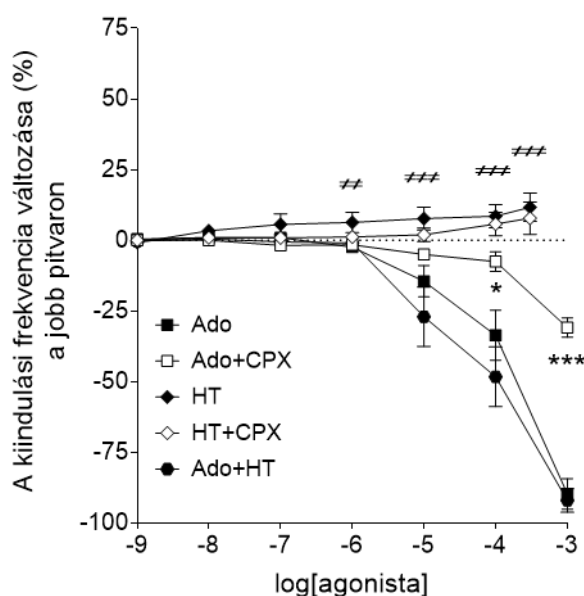
Az alsó, egymás melletti két panelen az  $x$  tengelyen az agonista moláris koncentráció 10-es alapú logaritmus van feltüntetve, az  $y$  tengelyen pedig a kiindulási kontrakciós erő százalékos változása (0%: a kiindulási kontrakciós erő; -100%: a pitvar leállása; 75%: a kiindulási kontrakciós erő 75%-os, vagyis 1.75-szeres növekedése). Ado: natív adenosin E/c görbe (a P1 és P2 protokollok „pool”-ozott adatai); Ado+CPX: 10  $\mu$ M CPX mellett generált adenosin E/c görbe (a P2 protokoll szerint); HT: natív HT E/c görbe (a P1 protokoll szerint); HT+CPX: 10  $\mu$ M CPX jelenlétében készített HT E/c görbe (a P2 protokoll szerint); Ado+HT: 411  $\mu$ M HT mellett készített adenosin E/c görbe (a P1 protokoll szerint); SEM: standard error of the mean.  $\neq$ : HT vs Ado; \*: Ado+CPX vs Ado;  $\times$ : Ado+HT vs Ado (1 jelölő:  $p < 0,05$ ; 2 jelölő:  $p < 0,01$ ; 3 jelölő:  $p < 0,001$ ).

#### 4.1.2. A jobb pitvari chronotrop válasz

Az inotropiához hasonló módon alakult a jobb pitvari chronotrop válasz is. Az adenosin markáns negatív chronotrop választ váltott ki a spontán kontraháló jobb pitvarokon.

A negatív chronotrop válasz azonban – a negatív inotrop válaszhoz képest (5. ábra) – vontatottan fejlődött ki, vagyis kisebb adozin koncentrációknál elég kicsi maradt, nagyobb adozin koncentrációknál viszont elérte a negatív inotrop válasz nagyságát (6. ábra).

A CPX jelentősen csökkentette az adozin kiváltotta negatív chronotrop hatást. A HT gyenge pozitív chronotrop hatást váltott ki, mely szignifikánsan különbözött az adozin kiváltotta negatív chronotrop hatástól. A HT hatását valamelyest csökkentette a CPX, ez viszont statisztikailag nem volt szignifikáns. Az adozin chronotrop hatását nem változtatta meg jelentősen, ha 411  $\mu\text{M}$  HT is jelen volt (6. ábra).



6. ábra. Az adozin és a HT által kiváltott chronotrop hatás (átlag  $\pm$  SEM) spontán működő jobb pitvaron. Az  $x$  tengelyen került felvételre az agonista moláris koncentrációjának 10-es alapú logaritmus, míg az  $y$  tengelyen a spontán nyugalmi frekvencia százalékosan kifejezett változása (0%: a kiindulási frekvencia; -100%: a pitvar leállása; 75%: a kiindulási frekvencia 75%-os, vagyis 1.75-szeres növekedése). Ado: adozin E/c görbe (a P1 és P2 protokollok „pool”-ozott adatai); Ado+CPX: 10  $\mu\text{M}$  CPX jelenlétében készített adozin E/c görbe (a P2 protokoll szerint); HT: HT E/c görbe (a P1 protokoll szerint); HT+CPX: 10  $\mu\text{M}$  CPX jelenlétében készített HT E/c görbe (a P2 protokoll szerint); Ado+HT: 411  $\mu\text{M}$  HT jelenlétében készített adozin E/c görbe (a P1 protokoll szerint); SEM: standard error of the mean. #: HT vs Ado; \*: Ado+CPX vs Ado (1 jelölő:  $p < 0,05$ ; 2 jelölő:  $p < 0,01$ ; 3 jelölő:  $p < 0,001$ ).

## 4.2. *In silico* eredmények

### 4.2.1. Az illesztett egyenletek formájának jelentősége

Az individuális (lokális) és kétmodelles globális illesztés alkalmazásakor a torzult E/c görbék torzító koncentrációira ( $c_x$ ) kapott becslések szinte azonosak voltak, melyet nem befolyásolt a regresszió hagyományos illetve robusztus módja (3-5. táblázat). Az intakt E/c görbéknél nem alkalmaztunk torzító koncentrációt, tehát esetükben az RRM várt becslése nulla volt. Az intakt E/c görbékre vonatkozó, individuális regresszióval kapott becslések, habár ránézésre elég változatosak voltak, mindegyik nulla vagy ahhoz közeli értéket mutatott (3-5. táblázat). Az egyszerűség érdekében a továbbiakban csak a 10. és a 11. egyenlettel kapott eredményeket mutatom be (vö. 3. és 4. táblázat), kivéve, ha a 9. egyenlet becslései valami miatt kiemelt figyelmet érdemelnek.

A 9. egyenlettel végzett egymodelles globális illesztés viszont egyértelműen rossz becslésekhez és/vagy a görbeillesztő szoftver hibaüzeneteihez vezetett. A 10. és a 11. egyenlet egymodelles globális becslései már elfogadhatóak voltak, emellett mérsékelten különböztek egymástól, melyet nem érintett a regresszió hagyományos vagy robusztus módja. Az intakt E/c görbékre kapott becsléseknél a 11. egyenlet nullához közelebbi eredményeket adott, mint a 10. egyenlet, tehát a 11. egyenlet pontosabb volt a 10. egyenletnél (vö. 3. és 4. táblázat).

		CPA E/c görbék intakt                      torzult (100 nM)		NECA E/c görbék intakt                      torzult (100 nM)		CHA E/c görbék intakt                      torzult (300 nM)		
Individuális	hagy.	log <sub>c<sub>x</sub></sub>	-19107	-6,88	-8,92	-6,87	-52574	-6,45
		95% CI	<i>széles</i>	-6,93 – -6,83	? – -8,32	-6,92 – -6,83	<i>széles</i>	-6,55 – -6,36
		c <sub>x</sub> (nM)	≈ 0	<b>131,4</b>	<b>1,2</b>	<b>133,6</b>	≈ 0	<b>352,7</b>
rob.		log <sub>c<sub>x</sub></sub>	-19107	-6,9	-8,64	-6,88	-52574	-6,47
		c <sub>x</sub> (nM)	≈ 0	<b>125,9</b>	<b>2,3</b>	<b>131,4</b>	≈ 0	<b>335,8</b>
Egymodelles globális	hagy.	log <sub>c<sub>x</sub></sub>	-7201	-6,84	-35267	-6,77	-1,17·10 <sup>10</sup>	-6,39
		95% CI	<i>széles</i>	<i>széles</i>	<i>széles</i>	<i>széles</i>	<i>széles</i>	<i>széles</i>
		c <sub>x</sub> (nM)	≈ 0	<b>145,9</b>	≈ 0	<b>170</b>	≈ 0	<b>403,7</b>
rob.		log <sub>c<sub>x</sub></sub>	-7209	-6,85	-35267	-6,82	-1,17·10 <sup>10</sup>	-6,36
		c <sub>x</sub> (nM)	≈ 0	<b>142,6</b>	≈ 0	<b>153,3</b>	≈ 0	<b>439</b>
Kétdodelles globális	hagy.	log <sub>c<sub>x</sub></sub>		-6,84		-6,77		-6,39
		95% CI	na	-6,97 – -6,7	na	-6,87 – -6,67	na	-6,62 – -6,17
		c <sub>x</sub> (nM)		<b>145,9</b>		<b>170</b>		<b>403,7</b>
rob.		log <sub>c<sub>x</sub></sub>		-6,85		-6,82		-6,36
		c <sub>x</sub> (nM)	na	<b>142,7</b>	na	<b>153,2</b>	na	<b>439</b>

3. táblázat. A 11. egyenlettel kapott log<sub>c<sub>x</sub></sub> értékek és 95%-os konfidencia intervallumaik (95% CI), valamint az utólag kiszámolt és nM-ra váltott c<sub>x</sub> értékek, mint az RRM becslései. Az elemzett E/c görbék egy korábbi *ex vivo* vizsgálat (Szabó és mtsai, 2019a) hat csoportjából (ld. az oszlopfejléceket) származnak. Három fő illesztési módot használtunk két további illesztési lehetőséggel kombinálva (ld. a sorfejléceket). CPA: N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine; NECA: 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine; CHA: N<sup>6</sup>-cyclohexyladenosine; hagy.: hagyományos (ordinary least-squares) regresszió; rob.: robusztus regresszió; ?: bizonytalan érték; na: nem alkalmazható

		CPA E/c görbék intakt                      torzult (100 nM)		NECA E/c görbék intakt                      torzult (100 nM)		CHA E/c görbék intakt                      torzult (300 nM)		
Individuális	hagy.	$c_x$ (nM)	<b>7,18·10<sup>-17</sup></b>	<b>131,4</b>	<b>1,23</b>	<b>133,6</b>	<b>2,57·10<sup>-16</sup></b>	<b>352,7</b>
		95% CI (nM)	?	116,9	?	119,5	?	281,8
			0,91	147,2	4,83	148,6	6,72	436,5
	rob.	$c_x$ (nM)	<b>6,22·10<sup>-17</sup></b>	<b>125,9</b>	<b>2,27</b>	<b>131,4</b>	<b>8,18·10<sup>-17</sup></b>	<b>335,8</b>
Egymodelles glob.	hagy.	$c_x$ (nM)	<b>6,08</b>	<b>139,7</b>	<b>20,07</b>	<b>211,9</b>	<b>24,28</b>	<b>357,4</b>
		95% CI (nM)	<i>széles</i>	<i>széles</i>	<i>széles</i>	143,9	<i>széles</i>	<i>széles</i>
						?		
	rob.	$c_x$ (nM)	<b>3,53·10<sup>-11</sup></b>	<b>143</b>	<b>29,5</b>	<b>196,1</b>	<b>4,24·10<sup>-11</sup></b>	<b>451,2</b>
Kétmodelles globális	hagy.	$c_x$ (nM)		<b>145,9</b>		<b>170</b>		<b>403,7</b>
		95% CI (nM)	na	107,8	na	136,4	na	238,7
				199,3		211,9		682,6
	rob.	$c_x$ (nM)	na	<b>142,7</b>	na	<b>153,2</b>	na	<b>439</b>

4. táblázat. A 10. egyenlettel kapott, nM-ra átváltott  $c_x$  értékek, mint az RRM becslései, és ezek 95%-os konfidencia intervallumai (95% CI). Az elemzett E/c görbék egy korábbi *ex vivo* vizsgálat (Szabó és mtsai, 2019a) hat csoportjából (ld. az oszlopfejléceket) származnak. Három fő illesztési módot használtunk két másik illesztési lehetőséggel kombinálva (ld. a sorfejléceket). CPA: N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine; NECA: 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine; CHA: N<sup>6</sup>-cyclohexyladenosine; hagy.: hagyományos (ordinary least-squares) regresszió; rob.: robusztus regresszió; ?: bizonytalan érték; na: nem alkalmazható

Ha az illesztés sikeres volt, akkor nem volt jelentős különbség a precizításban a  $c_x$ -et és a  $\log c_x$ -et tartalmazó modellek között a 95%-os konfidencia intervallumok, valamint a 95%-os konfidencia és előrejelzési sávok alapján (vö. 3. és 4. táblázat, továbbá az 7-9. ábra bal és jobb oldali paneljei). Érdekes módon a NECA E/c görbékre való egymodelles globális illesztés csak a 10. egyenlet alkalmazásakor produkált megjeleníthető eredményt a konfidencia és előrejelzési sávokról (minden más esetben megjeleníthetetlenül rossz eredmények születtek) (8. ábra).

Összefoglalásképpen elmondható, hogy a 11. egyenlet adta a legjobb eredményeket, melyet a 10. egyenlet, majd a 9. egyenlet követett. Ezek alapján megállapítható, hogy:

- a  $c_x$  használata (a  $\log c_x$  helyett) az RRM modelljében nem javította sem a becslés pontosságát, sem a precizitását;
- az RRM egyszerűsített modellje megbízhatóbb volt, mint az algebrailag egyenértékű, de bonyolultabb forma;
- az RRM-el történő becslés szempontjából semmilyen előnnyel nem járt a  $c_x$ -el való osztás mellőzése (még az intakt E/c görbék esetében sem).

#### 4.2.2. A modellek számának és használati módjának hatása

A pontosság az individuális regresszió esetében volt a legjobb, melyet a többi módszer egyébként csak kis különbségekkel követett. Ha az RRM modelljében  $\log c_x$  volt, a globális regresszió pontosságát egyáltalán nem befolyásolta az illesztett modellek száma. A pontosságot kevésbé befolyásolta a regresszió hagyományos vagy robusztus módja. Annak, hogy az RRM modellben  $c_x$  vagy  $\log c_x$  volt-e, ennél valamivel nagyobb hatása volt. Az intakt E/c görbékre minden esetben a várt nulla értékhez közeli becsléseket kaptuk, különösen a  $\log c_x$ -et tartalmazó RRM modell illesztésekor (3. és 4. táblázat).

A 95%-os konfidencia intervallumok alapján az individuális illesztés volt a legprecízebb, de csak a torzult E/c görbék esetében. A precizitás elfogadható volt kétmodelles globális regresszió esetén (minden esetben), míg értékelhetetlenül rossz volt egymodelles globális illesztéskor (minden esetben) és az intakt E/c görbék individuális regressziójakor (3. és 4. táblázat). Ennek háttérében egymodelles globális regresszió esetén az állt, hogy mind a  $c_x$  (10. egyenlet), mind a  $\log c_x$  (11. egyenlet) erős korrelációt mutatott a többi paraméterrel. Mindamellet a  $c_x$  használata növelte a többi paraméter közötti korrelációt is, sőt a 9. egyenlet használata (amiben szintén  $c_x$  van) egyenesen meggátolta a sikeres egymodelles globális illesztést. A 95%-os konfidencia és előrejelzési sávokkal kapott eredmények megerősítik a 95%-os konfidencia intervallumok alapján leszűrt tapasztalatokat (7-9. ábra).

Összefoglalásul elmondhatjuk, hogy a kétmodelles globális regresszió tekinthető a legprecízebbnek, melyet szorosan követ az individuális illesztés, míg az egymodelles globális illesztés messze a legkevésbé precíz (3. és 4. táblázat, 7-9. ábra).

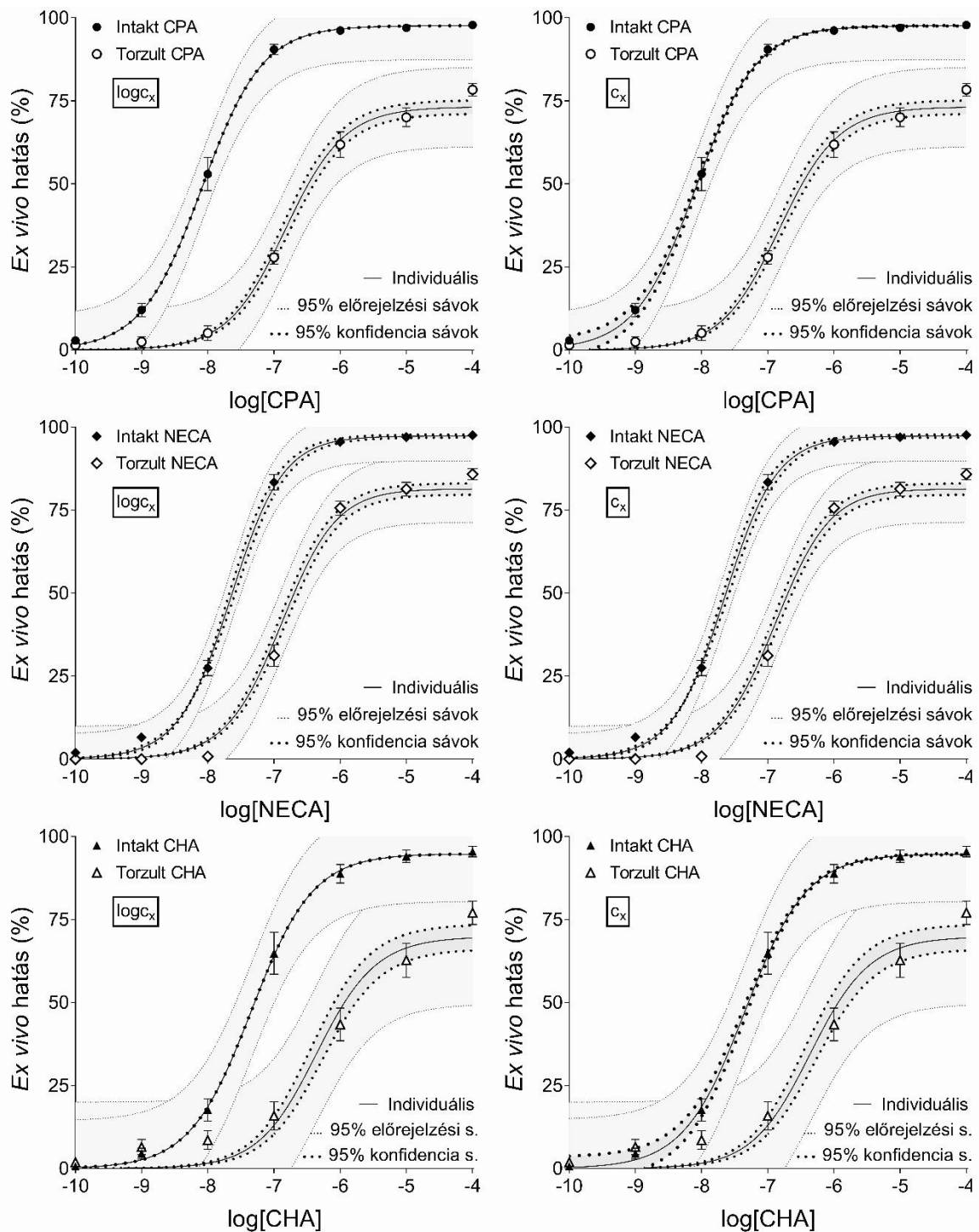
A használat kényelme szempontjából a globális regresszió könnyebben megvalósítható, mint az individuális, ezen belül is az egymodelles globális illesztés volt a legkényelmesebb. A  $c_x$  vagy  $\log c_x$  használata, illetve a regresszió hagyományos vagy robusztus volta természetesen nem befolyásolta a kényelmet.

Érdeemes megemlíteni még, hogy minden regressziós érték jól centrált volt, vagyis a 95%-os konfidencia intervallumok szimmetrikusak (vagy közel azok) voltak. Ez arra utal, hogy az illesztett modellekben a paraméterek jól voltak megválasztva.

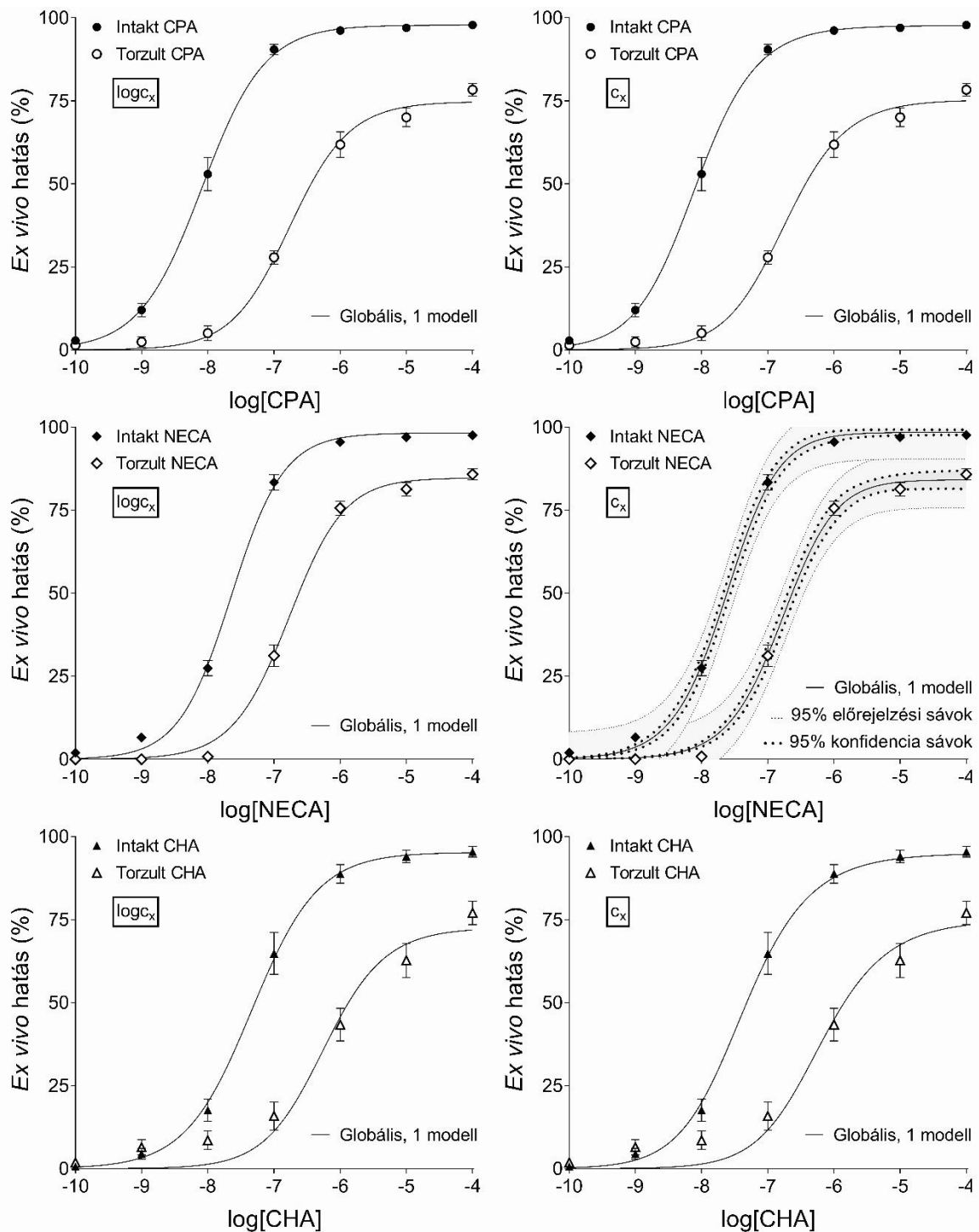
#### *4.2.3. Az egyszerre illesztett torzult E/c görbék számának hatása*

Ha egy intakt E/c görbéhez egynél több torzult E/c görbe tartozik, a globális regresszió lehetővé teszi az összetartozó E/c görbék (a görbecsalád) egyszerre történő illesztését, de emellett lehetőség van páronkénti illesztésre is, vagyis a torzult E/c görbék külön-külön párosítására és illesztésére az intakt E/c görbével. Ez utóbbi fokozza az intakt E/c görbék befolyását az illesztés kimenetelére. Az egyszerűség kedvéért az E/c görbecsaládok (forrás: Gesztelyi és mtsai, 2004) RRM-mel való meghatározásának vizsgálatához csak a 7. és 11. egyenletet használtuk: az egymodelles globális regresszióhoz csak a 11. egyenletet, a kétmodelleshez mindkettőt. A teljeskörű összehasonlíthatóság érdekében individuális regressziót is végeztünk (amihez szintén mindkét egyenletre szükség volt), noha az E/c görbecsaládok individuális illesztésénél nem adódik plusz lehetőség.

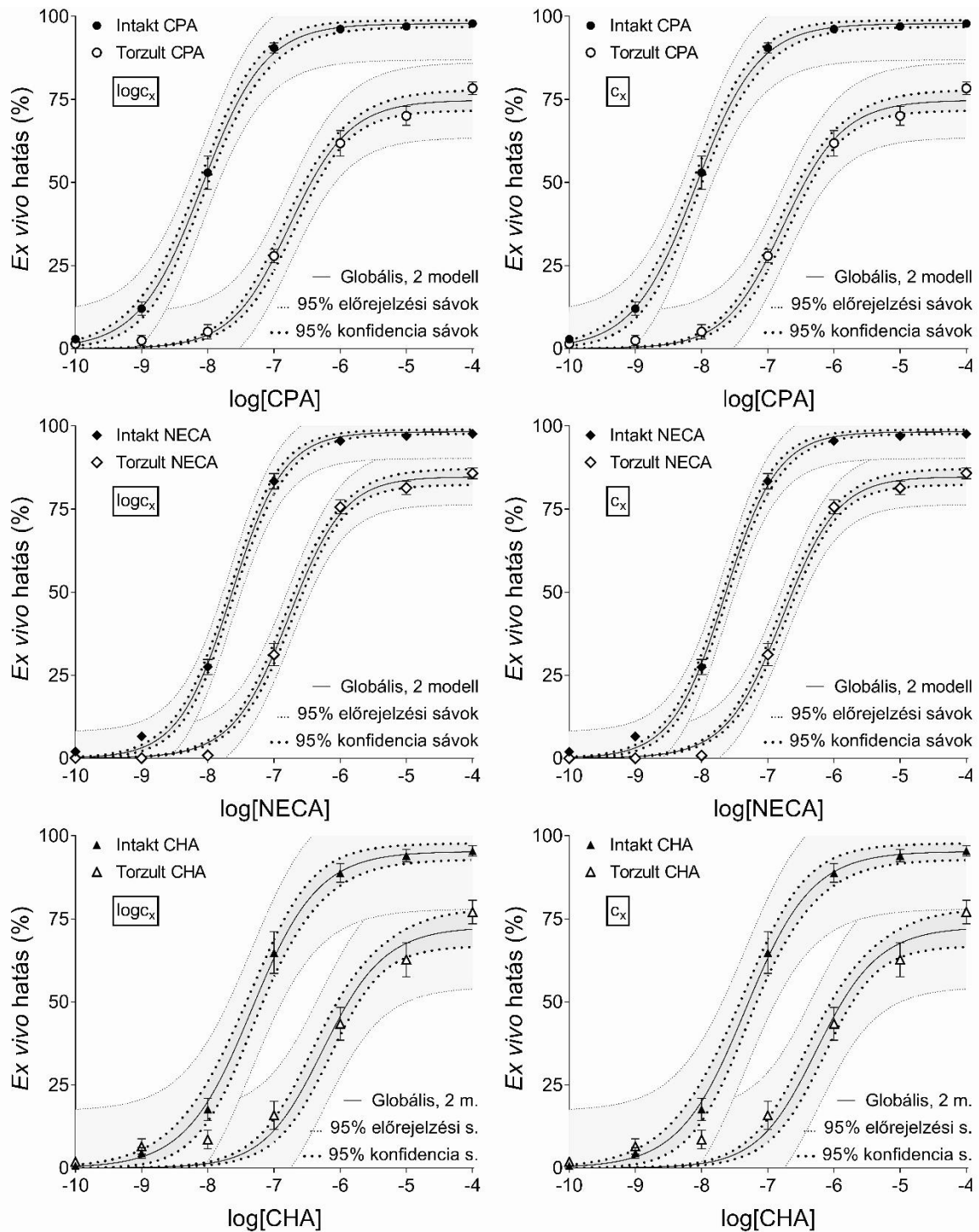
Pontosság tekintetében a regresszió valamennyi vizsgált módja hasonló mértékben volt alkalmas a görbecsaládokon belüli két nagyobb torzító koncentráció meghatározására. A legkisebb torzító koncentrációra adott becslések azonban csak az individuális és a páronkénti technikával végzett globális regresszió esetén voltak elfogadhatóak. Az intakt E/c görbék becslésekor minden esetben nullához közeli eredményeket kaptunk (mármint individuális és egymodelles globális illesztés esetén, ahol erre lehetőség van) (5. és 6. táblázat).



7. ábra. Az RRM 11. (bal panelek) és 10. (jobb panelek) egyenletének hagyományos és individuális illesztése korábbi *ex vivo* vizsgálatból (Szabó és mtsai, 2019a) származó intakt és torzult E/c görbepárokra. Az  $x$  tengelyen az E/c görbe agonistájára vonatkozó moláris koncentráció logaritmusai látható, míg az  $y$  tengelyen a hatás (a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenése). Az intakt E/c görbék (tömör jelölők) konvencionálisak, míg a torzult E/c görbék (üres jelölők) a görbefelvételhez használt agonista egy figyelmen kívül hagyott extra koncentrációjának jelenlétében készültek. A jelölők a válaszok csoportátlagait mutatják ( $\pm$  SEM). A folytonos vonalak az illesztett 10. és 11. egyenletet reprezentálják, a vastag szaggatott vonalak a 95%-os konfidencia sávokat, a vékony szaggatott vonalak pedig a 95%-os előrejelzési sávokat. CPA: N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine; NECA: 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine; CHA: N<sup>6</sup>-cyclohexyladenosine



8. ábra. Az RRM 11. (bal panelek) és 10. (jobb panelek) egyenletének hagyományos és egymodelles globális illesztése korábbi *ex vivo* vizsgálatból (Szabó és mtsai, 2019a) származó intakt és torzult E/c görbepárokra. Az  $x$  tengelyen az E/c görbe előállításához alkalmazott agonista moláris koncentrációjának logaritmusá látható, az  $y$  tengelyen pedig a hatás (mint a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenése). Az intakt E/c görbék (tömör jelölők) konvencionálisak, míg a torzult E/c görbék (üres jelölők) a görbefelvételhez használt agonista egy figyelmen kívül hagyott extra koncentrációjának jelenlétében készültek. A jelölők a válaszok csoportátlagait jelzik ( $\pm$  SEM). A folytonos vonalak az illesztett 10. és 11. egyenletet mutatják, a vastag szaggatott vonalak a 95%-os konfidencia sávokat, a vékony szaggatott vonalak pedig a 95%-os előrejelzési sávokat. CPA: N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine; NECA: 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine; CHA: N<sup>6</sup>-cyclohexyladenosine



9. ábra. Az RRM 11. (bal panelek) és 10. (jobb panelek) egyenletének hagyományos és kétmodelles globális illesztése korábbi *ex vivo* vizsgálatból (Szabó és mtsai, 2019a) származó torzult E/c görbékre, míg utóbbiak intakt párjaira a Hill modellt reprezentáló 7. egyenlet került szimultán illesztésre. Az  $x$  tengelyen az E/c görbe agonistájára vonatkozó moláris koncentráció logaritmusára került feltüntetésre, míg az  $y$  tengelyen a hatás (mint a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenése). Az intakt E/c görbék (tömör jelölők) konvencionálisak, míg a torzult E/c görbék (üres jelölők) a görbefelvételhez használt agonista egy figyelmen kívül hagyott extra koncentrációjának jelenlétében készültek. A jelölők a válaszok csoportátlagait jelzik ( $\pm$  SEM). A folytonos vonalak az illesztett 7., 10. és 11. egyenletet mutatják, a vastag szaggatott vonalak a 95%-os konfidencia sávokat, a vékony szaggatott vonalak pedig a 95%-os előrejelzési sávokat. CPA: N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine; NECA: 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine; CHA: N<sup>6</sup>-cyclohexyladenosine

		intakt		torzult 3 nM		CPA E/c görbék intakt		torzult 30 nM		intakt		torzult 100 nM	
Individuális	hagy.	log <sub>c<sub>x</sub></sub>	-14,66	-8,1	na	-7,58	na	-7,62 – -7,55	na	-7,02	na	-7,09 – -6,95	
		95% CI	<i>széles</i>	-8,2 – -8,01								-7,09 – -6,95	
		c <sub>x</sub> (nM)	<b>2,2·10<sup>-6</sup></b>	<b>8,02</b>		<b>26,06</b>				<b>95,5</b>			
rob.		log <sub>c<sub>x</sub></sub>	-20375	-8,06	na	-7,59	na		na	-6,99			
		c <sub>x</sub> (nM)	<b>≈ 0</b>	<b>8,66</b>		<b>25,46</b>				<b>101,4</b>			
Egymodelles globális	hagy.	log <sub>c<sub>x</sub></sub>	-7237	-8,08	-7,04·10 <sup>8</sup>	-7,54	-1,52·10 <sup>7</sup>	-6,8					
		95% CI	<i>széles</i>	<i>széles</i>	<i>széles</i>	<i>széles</i>	<i>széles</i>	<i>széles</i>					
		c <sub>x</sub> (nM)	<b>≈ 0</b>	<b>8,37</b>	<b>≈ 0</b>	<b>28,95</b>	<b>≈ 0</b>	<b>159,2</b>					
rob.		log <sub>c<sub>x</sub></sub>	-7237	-8,07	-7,04·10 <sup>8</sup>	-7,53	-1,52·10 <sup>7</sup>	-6,8					
		c <sub>x</sub> (nM)	<b>≈ 0</b>	<b>8,46</b>	<b>≈ 0</b>	<b>29,83</b>	<b>≈ 0</b>	<b>158,3</b>					
Kémodelles globális	hagy.	log <sub>c<sub>x</sub></sub>	na	-8,08	na	-7,54	na	-6,8					
		95% CI	na	-8,25 – -7,94	na	-7,62 – -7,46	na	-6,93 – -6,65					
		c <sub>x</sub> (nM)		<b>8,37</b>		<b>28,95</b>		<b>159,2</b>					
rob.		log <sub>c<sub>x</sub></sub>	na	-8,07	na	-7,53	na	-6,8					
		c <sub>x</sub> (nM)		<b>8,46</b>		<b>29,83</b>		<b>158,3</b>					

5. táblázat. A 11. egyenlettel kapott log<sub>c<sub>x</sub></sub> értékek és 95%-os konfidencia intervallumaik (95% CI), valamint az utólag kiszámolt és nM-ra váltott c<sub>x</sub> értékek, mint az RRM becslései. Az elemzett E/c görbék egy korábbi *ex vivo* vizsgálat (Gesztelyi és mtsai, 2004) négy csoportjából (ld. az oszlopfejléceket) származnak. Az Intakt csoport a páronkénti illesztés intakt E/c görbékre vonatkozó minden becslését feltüntetendő szerepel háromszor (mindig a vele párosított torzult csoport előtt). Három fő illesztési módot használtunk két másik illesztési lehetőséggel kombinálva (ld. a sorfejléceket). CPA: N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine; hagy.: hagyományos (ordinary least-squares) regresszió; rob.: robusztus regresszió; na: nem alkalmazható

Precizitás vonatkozásában a páronként végzett globális illesztés hasonló eredményekre vezetett, mint az előző alfejezetben a 11. egyenlet kapcsán leírtak (5. és 6. táblázat, 10. ábra). A mindet-egyszerre típusú illesztéssel végzett globális regresszió azonban értékelhetetlenül kis precizitást mutatott (az alkalmazott modellek számától függetlenül). A legprecízebb módszernek a kétmodelles globális regresszió bizonyult páronkénti kivitelezés mellett, amit szorosan követett az individuális illesztés.

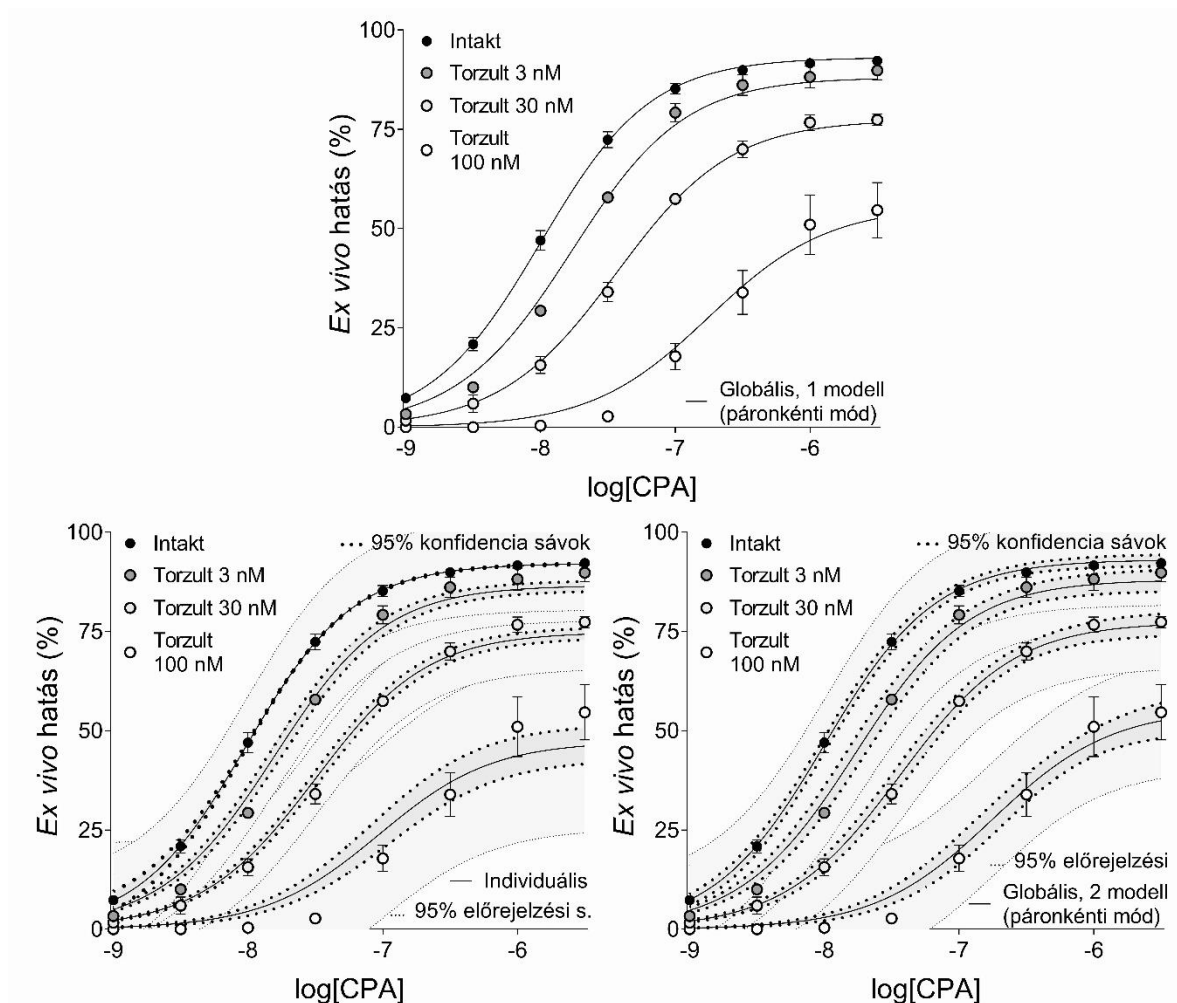
		intakt	CPA E/c görbék		
			torzult 3 nM	torzult 30 nM	torzult 100 nM
Egymodelles globális hagy.	log <sub>c<sub>x</sub></sub>	-1122	-198,9	-7,51	-6,85
	95% CI	<i>széles</i>	<i>széles</i>	<i>széles</i>	<i>széles</i>
	<b>c<sub>x</sub> (nM)</b>	<b>≈ 0</b>	<b>1,14·10<sup>-190</sup></b>	<b>30,94</b>	<b>142,1</b>
Egymodelles globális rob.	log <sub>c<sub>x</sub></sub>	-1122	-198,9	-7,5	-6,86
	<b>c<sub>x</sub> (nM)</b>	<b>≈ 0</b>	<b>1,14·10<sup>-190</sup></b>	<b>31,47</b>	<b>138,2</b>
Kétmodelles globális hagy.	log <sub>c<sub>x</sub></sub>		-116434	-7,51	-6,85
	95% CI	na	<i>széles</i>	<i>széles</i>	<i>széles</i>
	<b>c<sub>x</sub> (nM)</b>		<b>≈ 0</b>	<b>30,94</b>	<b>142,1</b>
Kétmodelles globális rob.	log <sub>c<sub>x</sub></sub>		-116434	-7,5	-6,86
	<b>c<sub>x</sub> (nM)</b>	na	<b>≈ 0</b>	<b>31,47</b>	<b>138,3</b>

6. táblázat. A 11. egyenlettel kapott log<sub>c<sub>x</sub></sub> értékek és 95%-os konfidencia intervallumaik (95% CI), valamint az utólag kiszámolt és nM-ra váltott c<sub>x</sub> értékek, mint az RRM becslései. Az elemzett E/c görbék egy korábbi *ex vivo* vizsgálat (Gesztelyi és mtsai, 2004) négy csoportjából (ld. az oszlopfejléceket) származnak. Két fő illesztési módot használtunk két másik illesztési lehetőséggel kombinálva (ld. a sorfejléceket) és mindet-egyszerre technikával kivitelezve (ezért volt elegendő az Intakt csoportot csak egyszer feltüntetni). CPA: N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine; hagy.: hagyományos (ordinary least-squares) regresszió; rob.: robusztus regresszió; na: nem alkalmazható

A kivitelezés kényelme szempontjából az RRM legjobb módja a mindet-egyszerre típusú egymodelles globális regresszió. Ezt követi a páronként végzett egymodelles globális regresszió, majd a mindet-egyszerre típusú kétmodelles globális regresszió, azután a páronkénti kétmodelles globális regresszió, míg legvégül a legkörülményesebb individuális illesztés.

Minden regressziós érték, amelyre lehetett 95%-os konfidencia intervallumot számolni, jól centrált volt, vagyis az illesztett modellek paraméterezése megfelelőnek bizonyult.

Az *in silico* eredményeket röviden a 7. táblázatban foglaltuk össze.



10. ábra. Az RRM 11. egyenletének hagyományos és egymodelles globális (felső panel), individuális (bal alsó panel), illetve (a 7. egyenlettel együtt) kétmodelles globális (jobb alsó panel) illesztése korábbi *ex vivo* vizsgálatból (Gesztelyi és mtsai, 2004) származó, egy intakt és három torzult E/c görbét tartalmazó görbecsaládokra, páronkénti technikával. Az  $x$  tengelyen az E/c görbe előállításához alkalmazott CPA moláris koncentrációjának logaritmusa látható, az  $y$  tengelyen pedig a hatás (a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenése). Az intakt E/c görbék (tömör jelölők) konvencionálisak, míg a torzult E/c görbék (a sötétszürkétől a fehérig terjedő színnel kitöltött jelölők) a görbefelvételhez használt agonista egy figyelmen kívül hagyott extra koncentrációjának jelenlétében készültek (ez a torzító koncentráció a jelölők színének világosodásával nőtt). A jelölők a válaszok csoportátlagait jelzik ( $\pm$  SEM). A folytonos vonalak az illesztett 7. (intakt E/c görbék) és 11. (torzult E/c görbék) egyenletet mutatják, a vastag szaggatott vonalak a 95%-os konfidencia sávokat, míg a vékony szaggatott vonalak a 95%-os előrejelzési sávokat. CPA: N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine

	<b>Individuális</b>		<b>Globális</b>			
	(lokális)		„mindet-egyszerre”		„páronkénti”	
		egymodelles	kétmodelles	egymodelles	kétmodelles	
<b>Pontosság</b>	nagyon jó	rossz/jó	rossz/jó	jó	jó	
<b>Megbízhatóság</b>	jó	rossz	rossz	rossz	nagyon jó	
<b>Kényelem</b>	igen nehézkes	igen könnyű	könnyű	könnyű	nehézkes	

7. táblázat. Az RRM három fő jellemzőjének alakulása a 11. egyenlet különbözőféleképpen való illesztése esetén

## 5. Megbeszélés

### 5.1. *Ex vivo* következtetések

A purinerg transzmisszió, amely magában foglalja az adenozinerg átvitelt is, az egyik legrégebbi és leggyakoribb szabályozó mechanizmus a többsejtű állati szervezetekben. Az adenozin több jelátviteli útvonalat is aktivál, melyek elsősorban védelmi és helyreállító funkcióval rendelkeznek (Geldenhuis és mtsai, 2017; Sousa és Diniz, 2017; Reiss és mtsai, 2019).

Az A<sub>1</sub> receptor, ami a myocardium fő adenozin receptortípusa, G<sub>i</sub> és G<sub>o</sub> fehérjék révén csökkenti a cAMP szintet és növeli a kifelé irányuló K<sup>+</sup>-áramot. Ez akut hatásait tekintve negatív trop hatásokhoz vezet, melyek különösen a pitvarokon kifejezettek (Belardinelli és mtsai, 1995; Fredholm és mtsai, 2001, 2011; Geldenhuis és mtsai, 2017; Sousa és Diniz, 2017; IJzerman és mtsai, 2022). A szív adenozinerg rendszerével kapcsolatos kutatások alapul szolgálhatnak bizonyos szív- és érrendszeri betegségek, különösen az ischaemiás szívbetegség és egyes supraventricularis arrythmiák kezelésére szolgáló gyógyszerek kifejlesztéséhez (Szentmiklósi és mtsai, 2011, 2015; Perfilova és mtsai, 2023).

Az újabb adenozin analógok fejlesztése több potenciális gyógyszerjelölt molekulát eredményezhet, melyek az eddigi tapasztalatok alapján jellemzően antiarrhythmias, fájdalomcsillapító, gyulladáscsökkentő vagy antivirális hatásokkal rendelkeznek (Tabrizchi és Bedi, 2001; Riksen és mtsai, 2008; Guieu és mtsai, 2021; Batra és mtsai, 2021; Kutryb-Zajac és mtsai, 2023; Perfilova és mtsai, 2023; Vincenzi és mtsai, 2023; Jacobson és mtsai, 2019, 2023). A vizsgálatunk tárgyát képező HT is egy nemrég szintetizált szerkezeti analóg. A molekulában ribóz helyett egy morfolinó alapú triciklusos kondenzált gyűrű, míg az adenin helyett hipoxantin található (4. ábra). Ezt az analógot antivirális terápiára szánták és erre vonatkozóan vizsgálták is a vegyületet (Kicsak, 2018; Kicsak és mtsai, 2018). A jelen *ex vivo* vizsgálat célja az volt, hogy feltárjuk a HT potenciális inotrop és chronotrop hatásait patkányból izolált bal és jobb pitvaron.

Eredményeink alapján a HT gyenge pozitív inotrop és még gyengébb chronotrop hatással rendelkezik. A szelektív, ortosztérikus és reverzibilis A<sub>1</sub> receptor antagonistá CPX-el mind a pozitív inotrop, mind a pozitív chronotrop hatás gátlható volt, azonban (feltehetően az eleve kis hatás értékeket terhelő jelentős szórás miatt) a gátlás statisztikailag

nem bizonyult szignifikánsnak (5., 6. ábra).

Mivel egy receptor ortosztérikus kötőhelyéhez való kapcsolódás révén kifejtett hatás legfontosabb farmakológiai bizonyítéka az adott hatásnak egy szelektív, ortosztérikus antagonistával való gátolhatósága, nem állíthatjuk teljes bizonyossággal, hogy a HT pozitív trop hatásait az  $A_1$  receptor ortosztérikus kötőhelyéhez kötődve váltja ki. Amennyiben mégis így van, a HT az  $A_1$  receptor ortosztérikus inverz agonistája (mivel az endogén agonista adenzin negatív trop hatásokat mediál).

Az  $A_1$  receptor inverz agonizmusa egyébként ritkán megfigyelt jelenség. Amikor eddig egy  $A_1$  receptor ligand esetében inverz agonista viselkedést tapasztaltak, az jellemzően gyenge hatásokat foglalt magába (He és mtsai, 2013; Lu és mtsai, 2014). Más receptorok esetében is relatíve későn azonosították azok inverz agonistáit, mivel ezeket sok kísérleti rendszerben nehéz elkülöníteni az antagonistáktól (Greasley és mtsai, 2006).

A HT jelenlétében készített adenzin E/c görbék hasonló lefutást mutattak, mint az önmagukban felvett (natív) adenzin E/c görbék (5., 6. ábra). Feltételezve, hogy a HT általunk megfigyelt hatásait az  $A_1$  receptor mediálja, valószínűsíthetjük, hogy számottevően kisebb affinitással képes kötődni az  $A_1$  receptorhoz, mint az adenzin, ezért könnyen leszorítható a receptorról. Kiemelendő továbbá, hogy a HT valamelyest fokozta az adenzin negatív inotrop hatását (ami a bal pitvaron statisztikailag is szignifikáns volt) (5. ábra). Ezt a jelenséget végiggondolva logikusan adódik, hogy a pozitív inotrop HT megnövelte az adenzin által csökkenthető kontrakciós erőt, ami nagyobb negatív inotrop választ tett lehetővé az adenzin (nagyobb koncentrációi) számára.

Alternatívaként felvethető, hogy a HT nem kizárólag az  $A_1$  receptoron keresztül fejti ki pozitív trop hatásait, hanem rendelkezik egy ettől független szignalizációs (esetleg metabolikus) útvonallal is. Ez az alternatív útvonal magyarázatot nyújtana arra is, hogy a CPX miatt csak részben tudta gátolni a HT supraventricularis myocardiumon megfigyelt hatásait (5., 6. ábra).

Habár a kétféle pitvaron az inotrop hatások nagyon hasonlóak voltak, a jobb pitvari mérési adatokat nagyobb szórás terhelte, mint a bal pitvariakat (5. ábra). Ez rámutat arra, hogy az inotropia szempontjából az állandó frekvencián működtetett bal pitvar megbízhatóbb modellt kínál, mint a spontán működő jobb pitvar.

Összegezve a fentieket megállapíthatjuk, hogy az HT gyenge pozitív ino- és chronotrop hatásokkal rendelkezik mind a bal, mind a jobb pitvarokon, melyeket Wistar

patkányokból izoláltunk. Eredményeink alapján vélhetően kis affinitású, ortosztérikus, reverzibilis, gyenge  $A_1$  receptor inverz agonista sajátossággal rendelkezik, hatásai háttérben azonban nem zárható ki ezen kívüli mechanizmusok létezése sem.

## 5.2. *In silico* következtetések

Munkánk során az RRM különböző kivitelezési lehetőségeivel kapott eredményeket hasonlítottuk össze három fő szempont alapján: pontosság (a regressziót végző szoftver által adott becslés eltérése az általunk kialakított meghatározandó értéktől, az ún. torzító koncentrációtól), precizitás (a regressziót végző szoftver értékelése a meghatározás megbízhatóságáról) és kényelem (a kivitelező részéről szükséges idő, figyelem és előismeretek mennyisége). A meghatározást korábbi *ex vivo* kísérleteinkből (Gesztelyi és mtsai, 2004; Szabó és mtsai, 2019a) származó E/c görbepárokra (egy intakt és egy torzult E/c görbe) és görbecsaládokra (egy intakt és három torzult E/c görbe) végeztük.

Az RRM alapja egy egyszerű (vagyis nem többszörös), nemlineáris regresszióanalízis. Az RRM modell két változót ( $\log c$  és  $E'$ ) és legalább egy variábilis paramétert ( $\log c_x$  vagy  $c_x$ ) tartalmaz. A  $\log c$  azon stabil agonista koncentrációjának logaritmus, amelyet E/c görbe felvételéhez használunk. Az  $E'$  olyan hatás(érték), amelyet részben az E/c görbe előállításához alkalmazott agonista ( $E'$ -höz tartozó) koncentrációja váltott ki egy biológiai rendszerben, részben viszont valami más okozott, amit nem vettünk figyelembe az  $E'$  meghatározásánál. A  $\log c_x$  (illetve  $c_x$ ) paraméter szerepe az, hogy a regresszió során számszerűsítse ezt a „valamit”. Ez a számszerűsítés az E/c görbe előállításához alkalmazott agonista azon koncentrációjával történik, ami ugyanakkora torzulást (látszólagos válaszkészség-csökkenést) okoz, mint az eredeti kiváltó tényező. Egyszerű esetben ez a számszerűsítendő tényező egy agonista egyetlen, állandó koncentrációja, ami jelen volt már az adott biológiai rendszerben az E/c görbe felvételét megelőzően is (de nem annyi ideig, hogy érdemleges receptor deszenzitizációt hozzon létre). Az RRM célja ennek a torzító agonista koncentrációnak a meghatározása. A legegyszerűbb esetben az RRM-hez használt agonista és a torzító agonista azonos, ekkor az RRM direkt módon a torzító koncentrációt becsüli az általa szolgáltatott  $c_x$  értékkel (vagy annak logaritmusát a  $\log c_x$  értékkel) (Gesztelyi és mtsai, 2004; Greczer és mtsai, 2010a, 2010b).

Habár az RRM eredendően egy lineáris összefüggést fogalmaz meg (lásd alapegyenletét, a 2. egyenletet), a koncentráció és a biológiai hatás közötti kapcsolat jellemzően nem lineáris. Ezért az RRM alapegyenletét a nemlineáris Hill egyenlettel kombináltuk, hogy a módszer képes lett a nyers (vagy csak minimálisan transzformált) E/c adatok kiértékelésére (Gesztelyi és mtsai, 2004; Greczer és mtsai, 2010a, 2010b). Ezáltal a kapott eredmények megbízhatóbbak lesznek, mivel minél jobban transzformáljuk az illesztendő adatokat, annál nagyobb a kockázata annak, hogy a nyers adatok biológiai variabilitása és a mérési hibák jelentős torzulást okoznak az eredményekben (Motulsky és Christopoulos, 2004).

A RRM nemcsak koncentrációbecslésre alkalmas (mint például az endogén adozin intersticiális felhalmozódásának meghatározására nukleozid transzport blokád során: Karsai és mtsai, 2006, 2007), hanem más típusú problémák megoldására is. Az RRM segítségével korrigálni lehet adozin receptor agonisták olyan E/c görbéit, melyeket az endogén adozin-szint növekedése torzított. Ennek megfelelően az RRM segített feltárni az EHNA /2-es típusú foszfodiészteráz (PDE2) és adozin-dezamináz (ADA) gátló/ enyhe pozitív inotrop hatását, ami részben valószínűleg a PDE2 gátlásból, részben pedig egy, az ADA gátlókra jellemző, eddig feltáratlan mechanizusból fakad (Gesztelyi és mtsai, 2003; Kemény-Beke és mtsai, 2007; Pák és mtsai, 2015). Emellett az RRM segítségével sikerült az FSCPX (irreverzibilis A<sub>1</sub> receptor antagonist) egy új tulajdonságát feltárni, nevezetesen azt, hogy valamilyen mechanizmussal, feltehetően egy ektonukleotidáz gátlásával csökkenti az intersticiális adozin koncentrációt. Ennek felgöngyölítése egy *in silico* (Zsuga és mtsai, 2017; Szabó és mtsai, 2019b) és *ex vivo* (Erdei és mtsai, 2018; Viczján és mtsai, 2021) vizsgálatokból álló kísérletsorozattal sikerült. Az RRM alkalmazása lehetővé tette az adozin kiváltotta direkt negatív inotrop hatáshoz tartozó A<sub>1</sub> receptor rezerv becslését, annak ellenére, hogy az adozin nehezen mérhető *ex vivo* (és *in vivo* is) rövid felezési ideje miatt (Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014; Zsuga és mtsai, 2017). Az RRM emellett hozzájárult annak tisztázásához, hogy a kannabidiol (egy széles körben használt fitokannabinoid) két lehetséges hatásmechanizmusa közül (A<sub>1</sub> receptor agonizmus illetve nukleozid transzport gátlás) melyik lehet felelős az adozinerg aktivitás fokozásáért (eredményeink szerint a nukleozid transzport gátlása) (Viczján és mtsai, 2022).

Az RRM alapegyenlete (2. egyenlet) leírja a kapcsolatot a torzult hatás (E', melyet csökkent válaszkészségű biológiai rendszerben mérhetünk bizonyos körülmények között) és a hozzá tartozó intakt hatás (E, amit ugyanazon rendszer intakt válaszkészségű állapotában

mérhetünk) között. Ezt az összefüggést magában foglalva az RRM modellje (3. egyenlet, 8-11. egyenlet) összekapcsolja a torzult hatást, az E/c görbe agonistájának koncentrációját ( $c$ , de általában inkább annak logaritmusát:  $\log c$ ) és a csökkent válaszkészség okát, amit torzító koncentrációként ( $c_x$ , vagy ennek logaritmusa:  $\log c_x$ ) kezel. Az RRM modellje tartalmazza a receptorfunkció egy kvantitatív modelljét is, ami által annak paramétereit is használja. Ez a receptorfunkciós modell legtöbbször a Hill egyenlet (1. egyenlet, 7. egyenlet), de kipróbálásra került már a Richards egyenlet is, csak túl bonyolultnak bizonyult gyakorlati problémák megbízható megoldására (Grenczer és mtsai, 2010b). Noha az egyszerűség a legtöbb gyakorlati kérdés megválaszolásánál előny, elméleti szempontból az RRM modellje úgy egészében is túlságosan leegyszerűsítettnek tekinthető. Ez akkor okozhat problémát, amikor az RRM-et két különböző agonista együttes hatásából származó E/c adatokra alkalmazzák. Elképzelhető, hogy ennek tudható a módszer néhány hiányossága (Grenczer és mtsai, 2010a, 2010b).

Az RRM-hez legalább két (típusú) E/c görbére van szükség. Intakt E/c görbe, ami az agonista hatását az intakt válaszkészséggel rendelkező rendszerben mutatja, továbbá torzult E/c görbe, ami ugyanazon agonista hatását a csökkent válaszkészségű rendszerben írja le. Az RRM modelljét az intakt E/c görbéből nyert információk felhasználásával kell illeszteni a torzult E/c görbére (Gesztelyi és mtsai, 2004; Grenczér és mtsai, 2010a; Szabó és mtsai, 2019a). Ez az „információátvitel” többféleképpen is megoldható, ez különbözteti meg az individuális (lokális), egymodelles globális és kétmodelles globális regressziót. A jelen disszertáció alapjául szolgáló *in silico* vizsgálat egyik célkitűzése az volt, hogy kiderítsük, a három illesztési mód közül melyik optimális az RRM kivitelezéséhez.

Mindemellett a kétmodelles globális illesztést felhasználtuk a  $\log c_x$  jelentőségének a tisztázására is az ép E/c görbék illesztése szempontjából. A kétmodelles globális regresszió ugyanis rendelkezik a globális illesztés előnyeivel (megbízhatóság, kényelem), de nem illeszti a  $\log c_x$ -et (illetve  $c_x$ -et) az intakt E/c görbére, ahol a  $c_x$  várt értéke a nulla. Az egymodelles globális regresszió során ugyanakkor elkerülhetetlen a  $\log c_x$  (vagy  $c_x$ ) intakt E/c görbére való illesztése. Ez azt az elméleti kérdést vetette fel, hogy okozhat-e problémát a  $\log c_x$  illesztése úgy, hogy a  $c_x$ -nek nullának kellene lennie, de a nullának nem lehet logaritmusa (Szabó és mtsai, 2019a).

A regresszió egyik érdekes sajátossága, hogy ekvivalens, de formailag különböző egyenletek illesztése valamelyest eltérő eredményeket adhat. Ebből következik *in silico*

vizsgálatunk másik célja, hogy kiderítsük, javíthatóak-e az RRM-mel kapott eredmények, ha (az algebrai ekvivalencia megőrzése mellett) egyszerűsítjük az RRM modelljét.

Ajánlások alapján ahhoz, hogy szimmetrikus konfidencia intervallumokat kapjunk, a log-normális (Galton) eloszlást követő paramétereket (pl. minden koncentráció jellegű mennyiség) logaritmusként kell használni a görbeillesztésre szánt modellekben (Motulsky és Christopoulos, 2004). Az RRM modelljében a torzító koncentráció logaritmikus ( $10^{\log c_x}$ ) és nem logaritmikus formában ( $c_x$ ) is kifejezhető, ami – az előbbiekből következően – befolyásolhatja magának a becslésnek is az eredményét. Mivel a kiértékelés során használt szoftver (újabb verziója) kezelni tudta az aszimmetrikus konfidencia intervallumokat is, megvizsgáltuk, hogy a torzító koncentráció melyik formája jobb az illesztéshez (a becslés és a meghatározás egészének tulajdonságaira koncentrálva). Ezért a jelen *in silico* vizsgálatban az RRM három különböző, de algebrailag ekvivalens modelljét (9-11. egyenlet) vizsgáltuk meg a becslés pontossága és a meghatározás precizitása szempontjából (kényelmi szempont e téren nem merült fel). A három RRM modell (9-11. egyenlet) három szempont alapján különbözött egymástól:

- a modell egészének formai összetettsége (az eredeti formához közelebb álló vagy egyszerűsített);
- $c_x$ -el való osztás az adott modell kialakítása során (van vagy nincs);
- a torzító koncentráció kvantifikálásának formája ( $c_x$  vagy  $10^{\log c_x}$ ).

Az eddig említett regressziós módok kombinálhatóak két további illesztési lehetőséggel, a regresszió hagyományos és robusztus módjával. Ezáltal figyelembe vehetjük az adatpontok szórásának eloszlását a regressziós függvény körül. Meg kell említeni azonban, hogy a robusztus regresszió kevesebb eredményt ad, nem teszi ugyanis lehetővé a precizitás meghatározását (Curve Fitting Guide, 2024).

Ezen túlmenően, ha egynél több torzult E/c görbe tartozik egy intakt E/c görbéhez, akkor két lehetőség is nyílik az RRM globális regresszióval való kivitelezésére: minden összetartozó E/c görbe egyszerre történő illesztése (mindet-egyszerre technika), vagy a torzult E/c görbék külön-külön való illesztése az intakt E/c görbével (páronkénti technika). Ez a két lehetőség is alkalmasint eltérő eredményekre vezethet, ezért döntöttünk a megvizsgálásuk mellett.

Eredményeink alapján, nagy vonalakban, az RRM elfogadhatóan pontosnak bizonyult a regressziós lehetőségek minden alkalmazott kombinációja esetén (3-6. táblázat). Ez alól a három legfontosabb kivétel:

- 1) a 9. egyenlet (az RRM nem egyszerűsített és  $c_x$ -et tartalmazó modelljének) egymodelles globális illesztése;
- 2) a 10. egyenlet (az RRM egyszerűsített és  $c_x$ -et tartalmazó modelljének) az intakt E/c görbékre való egymodelles globális illesztése (4. táblázat);
- 3) az E/c görbecsaládok legkisebb torzító koncentrációjának meghatározása mindet-egyszerre technikával való globális illesztéssel (6. táblázat).

Ezekből három fő (lentebb részletezett) tanulság vonható le:

- 1)  $c_x$  szerepeltetése az RRM modelljében ( $\log c_x$  helyett) inkább hátrányt jelent, mint előnyt;
- 2) az egyszerűsített modell előnyösebb az RRM számára, még a  $c_x$ -el való osztásból fakadó elméleti aggályok ellenére is (egy olyan paraméter esetében, ami nulla is kell, hogy lehessen);
- 3) a kis torzító koncentráció kihívást jelent az RRM számára, különösen, ha egy E/c görbecsalád mindet-egyszerre technikájú globális illesztésével kívánják meghatározni.

Ad 1) A  $c_x$  használata az RRM modelljében nem javította sem a pontosságot, sem a precizitást. Sőt, egyes esetekben a  $c_x$  rontotta a precizitást azáltal, hogy növelte a korrelációt az egyes paraméterek között, a 9. egyenlet (ami nincs egyszerűsítve és  $c_x$ -et tartalmaz) egymodelles globális illesztése pedig egyenesen lehetetlenné tette a meghatározást. Ez az eredményünk rávilágított arra, hogy munkacsoportunk korábban tévesen feltételezte, hogy a  $\log c_x$ -et tartalmazó RRM modell egymodelles globális illesztése azért teljesített várakozáson alul, mert az intakt E/c görbék esetében a  $c_x$  nem tudott nulla értéket felvenni (Szabó és mtsai, 2019a). Leszűrhetjük, hogy az RRM hiányosságai nem a  $\log c_x$  használatából erednek. Ezt a jelen *in silico* vizsgálat egy másik eredménye is megerősítette, miszerint a kétmodelles globális illesztés (melynél az RRM modell nem kerül kapcsolatba az intakt E/c görbékkel) nem javította az RRM pontosságát az egymodelles globális illesztéshez képest (mármint ahol ez utóbbi elfogadható becsléseket adott), noha a legprecízebbnek bizonyult (3. és 4. táblázat; 7-9. ábra).

Ad 2) Az RRM alkalmazása során tapasztalt nehézségek feltehetően a modell viszonylagos bonyolultságának tudhatók be, még az egyszerűsített 11. egyenlet esetében is.

Ezen túlmenően azonban megállapíthatjuk, hogy minél bonyolultabb egy regressziós modell, annál nagyobb mértékű korreláció léphet fel a modell paramétereinek között (Curve Fitting Guide, 2024). Ebből következően törekedni kell a lehető legegyszerűbb (még alkalmas) modell használatára (2. táblázat).

Ad 3) Korábbi *in silico* eredményeinkkel összhangban a jelen *in silico* vizsgálat is megerősítette, hogy a túl kicsi vagy túl nagy koncentrációkat az RRM jellemzően csak számottevő pontatlansággal tudja meghatározni (Grenczer és mtsai, 2010a, 2010b). Egy torzító koncentráció akkor tekinthető kicsinek vagy nagyoknak, ha a hatása ( $E_x$  a 2. egyenletben) kicsi vagy nagy az E/c görbékhez használt agonista maximális hatásához képest (ami az  $E_{max}$  a 3., 8-11. egyenletekben). E/c görbecsaládok esetében ugyanakkor a globális regresszió pontossága (kis koncentráció meghatározásakor) és precizitása (minden esetben) jelentősen javítható volt páronkénti technika alkalmazásával (vö. 5. és 6. táblázat). Ebből következően nem javasoljuk kettőnél több E/c görbe globális illesztését az RRM alkalmazásakor, annak ellenére sem, hogy kényelmes és a legtöbb esetben jó becslést ad. Ennek megfelelően a továbbiakban a globális regresszió eredményei közül azokat ismertetem, amelyeket páronkénti technikával kaptunk (ha nem, azt külön jelzem).

Ami a további regressziós lehetőségeket illeti, pontosság tekintetében az individuális illesztés bizonyult a legjobbnak, melyet szorosan követ a ( $\log c_x$ -el alkalmazott) globális regresszió, függetlenül a modellek számától. Ami a precizitást (vagyis a becslések megbízhatóságát) illeti, a kétmodelles globális regresszió teljesített a legjobban, ezt szorosan követte az individuális illesztés, majd messze lemaradva az egymodelles globális regresszió (3-6. táblázat). A használat kényelme szempontjából a legjobb az egymodelles globális regresszió volt, ezt követte a kétmodelles globális illesztés, majd a meglehetősen körülményes individuális regresszió (7. táblázat).

Az egymodelles globális illesztés kis precizitását szembetűnően mutatta, hogy mind a konfidencia intervallumok, mind a konfidencia és előrejelzési sávok meghatározhatatlanul tágak voltak (ami alól érdekes kivételt jelentett a NECA E/c görbékre illesztett 10. egyenlet) (8. ábra). Ennek a bizonytalanságnak az lehet az oka, hogy a torzító koncentrációt becsülő paraméterek ( $\log c_x$  vagy  $c_x$ ) az intakt E/c görbék illesztésekor nagymértékben függenek a többi paramétertől (vagyis nagy közöttük a korreláció). A másik eset, amikor hasonló mértékű korrelációt tapasztaltunk a paraméterek között, a legkisebb torzító koncentráció meghatározása volt mindet-egyszerre technikával végzett globális regresszióval (a modellek számától függetlenül).

A teljesség kedvéért az individuális regresszió javára meg kell említeni, hogy az RRM kivitelezésének legrégebbi módja támasztja a legkevesebb követelményt az alkalmazott görbeillesztő szoftverrel szemben. Ennek értékét persze csökkenti, hogy napjainkban sok olyan szoftver közül lehet választani, amelyeknek a globális regresszió nem képezi a szűk keresztmetszetét.

Itt bemutatott *in silico* vizsgálatunkban az RRM különböző kivitelezési módjai között a legtöbb különbséget a precizitás és a használat kényelme terén találtuk. Ezzel összhangban a regresszió hagyományos és robusztus módja között kevés különbséget tapasztalhattunk, hiszen a robusztus illesztés nem ad meg konfidencia intervallumokat, illetve konfidencia és előrejelzési sávokat. Ami a görbeillesztés kényelmét illeti, ezt a regresszió hagyományos vagy robusztus volta egyáltalán nem befolyásolja (3-6. táblázat).

Összefoglalva az eddigieket, az RRM kivitelezését a következőképpen javasoljuk:

- a  $\log c_x$ -et tartalmazó egyszerűsített modellel (ebben a disszertációban ez a 11. egyenlet volt);
- páronkénti technikával végzett kétmodelles globális regresszióval, esetleg individuális regresszióval (vagy az ellenőrzés kedvéért mindkettővel)
- hagyományos regresszióval, esetleg – pontatlan adatok esetén – robusztus illesztéssel (vagy ellenőrzésképpen mindkettővel).

## 6. Az új eredmények összefoglalása

A jelen értekezés alapjául szolgáló *ex vivo* vizsgálat során a HT (az adenzin DE GYTK Gyógyszerészi Kémia Tanszéken szintetizált analógja) inotrop és chronotrop hatását vizsgáltuk patkány pitvari myocardiumra. Eredményeink szerint a HT gyenge pozitív inotrop hatást váltott ki a bal és a jobb pitvaron is, amellelt – ezzel összhangban – a jobb pitvaron gyenge pozitív chronotrop hatása volt. CPX (szelektív  $A_1$  adenzin receptor antagonistá) jelenléte enyhén (és a statisztikai szignifikancia szintjét el nem érően) gátolta a HT inotrop és chronotrop hatásait. A HT hatásai adenzinnal könnyen áttörhetőek voltak. A fentiekből arra következtettünk, hogy a HT az  $A_1$  receptor gyenge (low-efficacy), reverzibilis, ortoszerikus, kis affinitású (low-affinity) és inverz agonistája. Emellelt nem zárható ki, hogy a HT  $A_1$  receptortól független útvonalon is hat.

A jelen disszertációt megalapozó *in silico* vizsgálatunkban a receptoriális válaszkészség módszer (RRM) különböző kivitelezési lehetőségeit hasonlítottuk össze a becslés pontossága, az eljárás precizitása (megbízhatósága) és a kivitelezés kényelme alapján. A következő regressziós lehetőségeket kombináltuk: **1.)** bonyolultabb vs. egyszerűbb (de algebrailag ekvivalens) RRM modellek; **2.)** logaritmikus ( $\log c_x$ ) vs. nemlogaritmikus ( $c_x$ ) fő paraméter az RRM modellben; **3.)** individuális (lokális) vs. egymodelles globális vs. kétmodelles globális illesztés; **4.)** görbecsalád (kettőnél több összetartozó adatsor) globális regressziója esetén mindet egyszerre vs. páronkénti illesztés; **5.)** hagyományos (ordinary least-squares) vs. robusztus regresszió. Eredményeink szerint: **1.)** az egyszerűbb modell jobb, mint a bonyolult (még ha az egyszerűsítés elméleti szempontból kifogásolható is); **2.)** a fő paramétert jobb logaritmusként ( $\log c_x$ ) használni; **3.)** az individuális illesztés a legpontosabb (emellelt elég precíz), a kétmodelles globális regresszió a legprecízebb (emellelt elég pontos), ugyanakkor a kétmodelles globális regresszió kényelmesebb, mint az individuális; **4.)** görbecsaládok esetén a kétmodelles globális illesztés csak páronként végezve elég pontos és precíz; **5.)** a hagyományos és a robusztus regresszió egyaránt megfelelő, pontos adatokhoz azonban hagyományos regressziót érdemes választani (hogy a precizitás megítélhető legyen), míg pontatlan adatoknál érdemes ellenőrzésképpen a robusztus illesztést is elvégezni. Tehát az RRM kivitelezéséhez páronkénti technikával végzett kétmodelles globális regresszió ajánlott (ellenőrzésképpen esetleg individuális regresszióval kiegészítve), a  $\log c_x$ -et tartalmazó egyszerűsített modell használatával, hagyományos módon (pontatlan adatok esetén robusztus illesztéssel kiegészítve).

## 7. Summary of the findings

In our *ex vivo* study underlying this thesis, we investigated the effect of hypoxanthine-tricyclano (an adenosine analogue synthesized at the Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Debrecen) on the inotropic and chronotropic regulation of the rat atrial myocardium. We found that hypoxanthine-tricyclano exerted a weak positive inotropic effect on both the left and right atrium, and, in line with this, it elicited a weak positive chronotropic effect on the right atrium. The presence of CPX (a selective A<sub>1</sub> adenosine receptor antagonist) slightly inhibited the inotropic and chronotropic effects of hypoxanthine-tricyclano (which action did not reach the level of statistical significance). The effects of hypoxanthine-tricyclano were easily surmountable with adenosine. Thus, we concluded that hypoxanthine-tricyclano may act as a weak (low-efficacy), reversible, orthosteric, low-affinity and inverse agonist of the A<sub>1</sub> receptor, although alternative mechanisms of action cannot be excluded.

In our *in silico* study underlying this thesis, we compared the different implementation options of the receptorial responsiveness method (RRM) in terms of accuracy of the estimation, precision (reliability) of the procedure and convenience of use. The following regression options were combined: **1**) more complicated *vs.* simpler (although algebraically equivalent) RRM models; **2**) logarithmic ( $\log c_x$ ) *vs.* non-logarithmic ( $c_x$ ) main parameter in the RRM model; **3**) individual (local) *vs.* one-model global *vs.* two-model global fitting; **4**) in the case of global regression for curve families (more than two related data sets), all-at-once *vs.* pairwise fitting; **5**) ordinary (least-squares) *vs.* robust regression. We have found that: **1**) the simpler model is better than the more complicated one (even if the simplification is theoretically objectionable); **2**) better to use the main parameter as a logarithm ( $\log c_x$ ); **3**) the individual fitting is the most accurate (and quite precise), the two-model global regression is the most precise (and quite accurate), while the two-model global regression is more convenient than the individual one; **4**) to fit curve families, the two-model global regression is only accurate and precise when performed in a pairwise manner; **5**) the ordinary and robust ways of regression are both suitable, but, for reliable data, it is worth choosing ordinary regression (so that the precision can be judged), while for scattered data, it is worth also performing robust fitting as a check. Thus, to implement RRM, two-model global regression implemented with a pairwise technique is recommended (perhaps together with individual regression as a check), using the simplified model containing  $\log c_x$ , with ordinary (least-squares) fitting (together with robust fitting in case of scattered data).

## 8. Irodalom

### 8.1. A disszertáció elkészítéséhez felhasznált irodalom

1. Antonioli L, Fornai M, Pellegrini C, Pacher P, Haskó G. Adenosine signaling as target in cardiovascular pharmacology. *Curr Opin Pharmacol.* 2023; 71: 102393. doi:10.1016/j.coph.2023.102393
2. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med.* 2013; 19(6): 355-367. doi:10.1016/j.molmed.2013.03.005
3. Auchampach JA, Jin X, Moore J, Wan TC, Kreckler LM, Ge ZD, Narayanan J, Whalley E, Kiesman W, Ticho B, Smits G, Gross GJ. Comparison of three different A1 adenosine receptor antagonists on infarct size and multiple cycle ischemic preconditioning in anesthetized dogs. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 308(3): 846-856. doi:10.1124/jpet.103.057943
4. Batra R, Jain V, Sharma P. Adenosine: a partially discovered medicinal agent. *Futur J Pharm Sci.* 2021; 7: 214. doi:10.1186/s43094-021-00353-w
5. Belardinelli L, Shryock JC, Song Y, Wang D, Srinivas M. Ionic basis of the electrophysiological actions of adenosine on cardiomyocytes. *FASEB J.* 1995; 9: 359-365. doi:10.1096/fasebj.9.5.7896004
6. Boeynaems JM, Communi D, Gonzalez NS, Robaye B. Overview of the P2 receptors. *Semin Thromb Hemost.* 2005; 31(2): 139-149. doi:10.1055/s-2005-869519
7. Borea PA, Gessi S, Merighi S, Vincenzi F, Varani K. Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. *Physiol Rev.* 2018; 98(3): 1591-1625. doi:10.1152/physrev.00049.2017
8. Buchwald P. A Receptor Model With Binding Affinity, Activation Efficacy, and Signal Amplification Parameters for Complex Fractional Response Versus Occupancy Data. *Front Pharmacol.* 2019; 10: 605. doi: 10.3389/fphar.2019.00605
9. Buchwald P. A three-parameter two-state model of receptor function that incorporates affinity, efficacy, and signal amplification. *Pharmacol Res Perspect.* 2017; 5(3): e00311. doi: 10.1002/prp2.311
10. Burnstock G. Introduction to Purinergic Signaling. *Methods Mol Biol.* 2020; 2041: 1-15. doi:10.1007/978-1-4939-9717-6\_1

11. Burnstock G. P2 purinoceptors: historical perspective and classification. *Ciba Found Symp.* 1996; 198: 1-34. doi:10.1002/9780470514900.ch1
12. Burnstock G. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22(3): 364-373. doi:10.1161/hq0302.105360
13. Camici M, Garcia-Gil M, Tozzi MG. The Inside Story of Adenosine. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(3): 784. doi:10.3390/ijms19030784
14. Caulfield MP, Birdsall NJ. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev.* 1998; 50(2): 279-90. PMID:9647869
15. Chang LC, Brussee J, Ijzerman AP. Non-xanthine antagonists for the adenosine A1 receptor. *Chem Biodivers.* 2004; 1(11): 1591-1626. doi:10.1002/cbdv.200490122
16. Curve Fitting Guide. Online elérhető (2024. július 17.): <https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/curve-fitting/index.htm>
17. Daly JW, Padgett WL, Shamim MT. Analogues of caffeine and theophylline: effect of structural alterations on affinity at adenosine receptors. *J Med Chem.* 1986; 29(7): 1305-1308. doi:10.1021/jm00157a035
18. Di Virgilio F, Vuerich M. Purinergic signaling in the immune system. *Auton Neurosci.* 2015; 191: 117-123. doi:10.1016/j.autneu.2015.04.011
19. Erdei T, Szabo AM, Lampe N, Szabo K, Kiss R, Zsuga J, Papp C, Pinter A, Szentmiklosi AJ, Szilvassy Z, Juhasz B, Gesztelyi R. FSCPX, a Chemical Widely Used as an Irreversible A<sub>1</sub> Adenosine Receptor Antagonist, Modifies the Effect of NBTI, a Nucleoside Transport Inhibitor, by Reducing the Interstitial Adenosine Level in the Guinea Pig Atrium. *Molecules.* 2018; 23(9): 2186. doi: 10.3390/molecules23092186
20. Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.* 2001; 53(4): 527-52. PMID:11734617
21. Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Linden J, Müller CE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacol Rev.* 2011; 63(1): 1-34. doi:10.1124/pr.110.003285
22. Fredholm BB, Yang J, Wang Y. Low, but not high, dose caffeine is a readily available probe for adenosine actions. *Mol Aspects Med.* 2017; 55:20-25. doi:10.1016/j.mam.2016.11.011

23. Geldenhuys WJ, Hanif A, Yun J, Nayeem MA. Exploring Adenosine Receptor Ligands: Potential Role in the Treatment of Cardiovascular Diseases. *Molecules*. 2017; 22(6): 917. doi:10.3390/molecules22060917
24. Gessi S, Merighi S, Fazzi D, Stefanelli A, Varani K, Borea PA. Adenosine receptor targeting in health and disease. *Expert Opin Investig Drugs*. 2011; 20(12): 1591-1609. doi:10.1517/13543784.2011.627853
25. Gesztelyi R, Zsuga J, Hajdú P, Szabó JZ, Cseppento A, Szentmiklósi AJ. Positive inotropic effect of the inhibition of cyclic GMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE2) on guinea pig left atria in eu- and hyperthyroidism. *Gen Physiol Biophys*. 2003; 22(4): 501-513
26. Gesztelyi R, Zsuga J, Juhász B, Dér P, Vecsernyés M, Szentmiklósi AJ. Concentration estimation via curve fitting: quantification of negative inotropic agents by using a simple mathematical method in guinea pig atria. *Bull Math Biol*. 2004; 66(5): 1439-1453. doi:10.1016/j.bulm.2004.03.001
27. Gesztelyi R, Zsuga J, Kemeny-Beke A, Varga B, Juhász B, Tosaki A. The Hill equation and the origin of quantitative pharmacology. *Arch Hist Exact Sci*. 2012; 66: 427-438. doi:10.1007/s00407-012-0098-5
28. Giraldo J, Vivas NM, Vila E, Badia A. Assessing the (a)symmetry of concentration-effect curves: empirical versus mechanistic models. *Pharmacol Ther*. 2002; 95(1): 21-45. doi:10.1016/s0163-7258(02)00223-1
29. Greasley PJ, Clapham JC. Inverse agonism or neutral antagonism at G-protein coupled receptors: a medicinal chemistry challenge worth pursuing? *Eur J Pharmacol*. 2006; 553(1-3): 1-9. doi:10.1016/j.ejphar.2006.09.032
30. Grençzer M, Pinter A, Zsuga J, Kemeny-Beke A, Juhász B, Szodoray P, Tosaki A, Gesztelyi R. The influence of affinity, efficacy, and slope factor on the estimates obtained by the receptorial responsiveness method (RRM): a computer simulation study. *Can J Physiol Pharmacol*. 2010a; 88(11): 1061-73. doi: 10.1139/y10-078
31. Grençzer M, Zsuga J, Majoros L, Pinter A, Kemeny-Beke A, Juhász B, Tosaki A, Gesztelyi R. Effect of asymmetry of concentration-response curves on the results obtained by the receptorial responsiveness method (RRM): an in silico study. *Can J Physiol Pharmacol*. 2010b; 88(11): 1074-83. doi: 10.1139/y10-089
32. Guieu R, Brignole M, Deharo JC, Deharo P, Mottola G, Gropelli A, Paganelli F, Ruf J. Adenosine Receptor Reserve and Long-Term Potentiation: Unconventional Adaptive Mechanisms in Cardiovascular Diseases? *Int J Mol Sci*. 2021; 22: 7584. doi:10.3390/ijms22147584

33. He W, Wilder T, Cronstein BN. Rolofylline, an adenosine A1 receptor antagonist, inhibits osteoclast differentiation as an inverse agonist. *Br J Pharmacol.* 2013; 170(6): 1167-76. doi:10.1111/bph.12342
34. Headrick JP, Peart JN, Reichelt ME, Haseler LJ. Adenosine and its receptors in the heart: regulation, retaliation and adaptation. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1808(5): 1413-1428. doi:10.1016/j.bbamem.2010.11.016
35. Holmgren M, Hedner J, Mellstrand T, Nordberg G, Hedner T. Characterization of the antinociceptive effects of some adenosine analogues in the rat. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1986; 334(3): 290-293. doi:10.1007/BF00508784
36. IJzerman AP, Jacobson KA, Müller CE, Cronstein BN, Cunha RA. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CXII: Adenosine Receptors: A Further Update. *Pharmacol Rev.* 2022; 74(2): 340-372. doi:10.1124/pharmrev.121.000445
37. Jacobson KA, Linden J. Pharmacology of purine and pyrimidine receptors. Preface. *Adv Pharmacol.* 2011; 61: xv-xvi. doi:10.1016/B978-0-12-385526-8.00020-5
38. Jacobson KA, Pradhan B, Wen Z, Pramanik A. New paradigms in purinergic receptor ligand discovery. *Neuropharmacology.* 2023; 230: 109503. doi:10.1016/j.neuropharm.2023.109503
39. Jacobson KA, Tosh DK, Jain S, Gao ZG. Historical and Current Adenosine Receptor Agonists in Preclinical and Clinical Development. *Front Cell Neurosci.* 2019; 13: 124. doi:10.3389/fncel.2019.00124
40. Karsai D, Gesztelyi R, Zsuga J, Jakab A, Szendrei L, Juhasz B, Bak I, Szabo G, Lekli I, Vecsernyes M, Varga E, Szentmiklosi AJ, Tosaki A. Influence of hyperthyroidism on the effect of adenosine transport blockade assessed by a novel method in guinea pig atria. *Cell Biochem Biophys.* 2007; 47(1): 45-52. doi:10.1385/cbb:47:1:45
41. Karsai D, Zsuga J, Juhász B, Dér P, Szentmiklósi AJ, Tósaki A, Gesztelyi R. Effect of nucleoside transport blockade on the interstitial adenosine level characterized by a novel method in guinea pig atria. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006; 47(1): 103-9. doi:10.1097/01.fjc.0000196239.51018.a0
42. Kazemzadeh-Narbat M, Annabi N, Tamayol A, Oklu R, Ghanem A, Khademhosseini A. Adenosine-associated delivery systems. *J Drug Target.* 2015; 23(7-8): 580-596. doi:10.3109/1061186X.2015.1058803
43. Kemeny-Beke A, Jakab A, Zsuga J, Vecsernyes M, Karsai D, Pasztor F, Greczner M, Szentmiklosi AJ, Berta A, Gesztelyi R. Adenosine deaminase inhibition enhances the inotropic response mediated by A1 adenosine receptor in hyperthyroid guinea pig atrium. *Pharmacol Res.* 2007; 56(2): 124-31. doi:10.1016/j.phrs.2007.04.017

44. Kicsák M, Mándi A, Varga S, Herczeg M, Batta G, Bényei A, Borbás A, Herczegh P. Tricyclanos: conformationally constrained nucleoside analogues with a new heterotricycle obtained from a d-ribofuranose unit. *Org Biomol Chem.* 2018; 16(3): 393-401. doi:10.1039/c7ob02296d
45. Kicsak M. Új heterotriciklust tartalmazó nukleozid analógok szintézise. 2018. április 23. Available from: <https://dea.lib.unideb.hu/dea/handle/2437/249958>
46. Kiss Z, Pak K, Zsuga J, Juhasz B, Varga B, Szentmiklosi AJ, Haines DD, Tosaki A, Gesztelyi R. The guinea pig atrial A1 adenosine receptor reserve for the direct negative inotropic effect of adenosine. *Gen Physiol Biophys.* 2013; 32(3): 325-35. doi:10.4149/gpb\_2013041
47. Kurachi, Y.; Nakajima, T.; Sugimoto, T. On the mechanism of activation of muscarinic K<sup>+</sup> channels by adenosine in isolated atrial cells: Involvement of GTP-binding proteins. *Pflugers Arch.* 1986; 407: 264-274. PMID:2429251
48. Kutryb-Zajac B, Kawecka A, Nasadiuk K, Braczko A, Stawarska K, Caiazzo E, Koszalka P, Cicala C. Drugs targeting adenosine signaling pathways: A current view. *Biomed Pharmacother.* 2023; 165: 115184. doi:10.1016/j.biopha.2023.115184
49. Lu M, Wang B, Zhang C, Zhuang X, Yuan M, Wang H, Li W, Su R, Li J. PQ-69, a novel and selective adenosine A1 receptor antagonist with inverse agonist activity. *Purinergic Signal.* 2014; 10(4): 619-29. doi:10.1007/s11302-014-9424-5
50. Mahmood A, Iqbal J. Purinergic receptors modulators: An emerging pharmacological tool for disease management. *Med Res Rev.* 2022; 42(4): 1661-1703. doi:10.1002/med.21888
51. Molina-Arcas M, Casado FJ, Pastor-Anglada M. Nucleoside transporter proteins. *Curr Vasc Pharmacol.* 2009; 7(4): 426-434. doi:10.2174/157016109789043892
52. Motulsky HJ, Christopoulos A. Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting. GraphPad Software Inc., San Diego, 2004. Online elérhető (2024. június 19.): [https://cdn.graphpad.com/faq/2/file/Prism\\_v4\\_Fitting\\_Models\\_to\\_Biological\\_Data.pdf](https://cdn.graphpad.com/faq/2/file/Prism_v4_Fitting_Models_to_Biological_Data.pdf)
53. Mundell S, Kelly E. Adenosine receptor desensitization and trafficking. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1808(5): 1319-1328. doi:10.1016/j.bbamem.2010.06.007
54. Pak K, Papp C, Galajda Z, Szerafin T, Varga B, Juhasz B, Haines D, Szentmiklosi AJ, Tosaki A, Gesztelyi R. Approximation of A1 adenosine receptor reserve appertaining to the direct negative inotropic effect of adenosine in hyperthyroid guinea pig left atria. *Gen Physiol Biophys.* 2014; 33: 177-88. doi: 10.4149/gpb\_2013079

55. Pak K, Zsuga J, Kepes Z, Erdei T, Varga B, Juhasz B, Szentmiklosi AJ, Gesztelyi R. The effect of adenosine deaminase inhibition on the A1 adenosinergic and M2 muscarinergic control of contractility in eu- and hyperthyroid guinea pig atria. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2015; 388(8): 853-68. doi:10.1007/s00210-015-1121-6
56. Pastor-Anglada M, Pérez-Torras S. Who Is Who in Adenosine Transport. *Front Pharmacol.* 2018; 9: 627. doi:10.3389/fphar.2018.00627
57. Pavan B, IJzerman AP. Processing of adenosine receptor agonists in rat and human whole blood. *Biochem Pharmacol.* 1998; 56: 1625-32. doi:10.1016/s0006-2952(98)00270-6
58. Perfilova VN, Muzyko EA, Taran AS, Shevchenko AA, Naumenko LV. Problems and prospects for finding new pharmacological agents among adenosine receptor agonists, antagonists, or their allosteric modulators for the treatment of cardiovascular diseases. *Biomed Khim.* 2023; 69: 353-370. doi:10.18097/PBMC20236906353
59. Peyronnet R, Ravens U. Atria-selective antiarrhythmic drugs in need of alliance partners. *Pharmacol Res.* 2019; 145: 104262. doi:10.1016/j.phrs.2019.104262
60. Porkka-Heiskanen T, Kalinchuk A, Alanko L, Urrila A, Stenberg D. Adenosine, energy metabolism, and sleep. *ScientificWorldJournal.* 2003; 3: 790-798. doi:10.1100/tsw.2003.65
61. Porkka-Heiskanen T, Kalinchuk AV. Adenosine, energy metabolism and sleep homeostasis. *Sleep Med Rev.* 2011; 15(2): 123-135. doi:10.1016/j.smrv.2010.06.005
62. Prinz H. Hill coefficients, dose-response curves and allosteric mechanisms. *J Chem Biol.* 2010; 3(1): 37-44. doi:10.1007/s12154-009-0029-3
63. Ralevic V, Dunn WR. Purinergic transmission in blood vessels. *Auton Neurosci.* 2015; 191: 48-66. doi:10.1016/j.autneu.2015.04.007
64. Ralevic V. Purinergic signalling in the cardiovascular system - a tribute to Geoffrey Burnstock. *Purinergic Signal.* 2021; 17(1): 63-69. doi:10.1007/s11302-020-09734-x
65. Ramadan A, Naydenova Z, Stevanovic K, Rose JB, Coe IR. The adenosine transporter, ENT1, in cardiomyocytes is sensitive to inhibition by ethanol in a kinase-dependent manner: implications for ethanol-dependent cardioprotection and nucleoside analog drug cytotoxicity. *Purinergic Signal.* 2014; 10(2): 305-312. doi:10.1007/s11302-013-9391-2
66. Reiss AB, Grossfeld D, Kasselmann LJ, Renna HA, Vernice NA, Drewes W, König J, Carsons SE, DeLeon J. Adenosine and the Cardiovascular System. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2019; 19(5): 449-464. doi:10.1007/s40256-019-00345-5

67. Riksen NP, Rongen GA, Yellon D, Smits P. Human in vivo research on the vascular effects of adenosine. *Eur J Pharmacol.* 2008; 585(2-3): 220-227. doi:10.1016/j.ejphar.2008.01.053
68. Ruan W, Li J, Choi S, Ma X, Liang Y, Nair R, Yuan X, Mills TW, Eltzschig HK. Targeting myocardial equilibrative nucleoside transporter ENT1 provides cardioprotection by enhancing myeloid Adora2b signaling. *JCI Insight.* 2023; 8(11): e166011. doi:10.1172/jci.insight.166011
69. Shryock JC, Belardinelli L. Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am J Cardiol.* 1997; 79: 2-10. doi:10.1016/s0002-9149(97)00256-7
70. Sousa JB, Diniz C. The Adenosinergic System as a Therapeutic Target in the Vasculature: New Ligands and Challenges. *Molecules.* 2017; 22(5): 752. doi:10.3390/molecules22050752
71. Szabo AM, Erdei T, Viczjan G, Kiss R, Zsuga J, Papp C, Pinter A, Juhasz B, Szilvassy Z, Gesztelyi R. An advanced in silico modelling of the interaction between FSCPX, an irreversible A1 adenosine receptor antagonist, and NBTI, a nucleoside transport inhibitor, in the guinea pig atrium. *Molecules.* 2019b; 24: E2207. doi: 10.3390/molecules24122207
72. Szabo AM, Viczjan G, Erdei T, Simon I, Kiss R, Szentmiklosi AJ, Juhasz B, Papp C, Zsuga J, Pinter A, Szilvassy Z, Gesztelyi R. Accuracy and Precision of the Receptorial Responsiveness Method (RRM) in the Quantification of A1 Adenosine Receptor Agonists. *Int J Mol Sci.* 2019a; 20(24): 6264. doi:10.3390/ijms20246264
73. Szentmiklósi AJ, Cseppento A, Harmati G, Nánási PP. Novel trends in the treatment of cardiovascular disorders: site- and event- selective adenosinergic drugs. *Curr Med Chem.* 2011; 18(8): 1164-1187. doi:10.2174/092986711795029753
74. Szentmiklosi AJ, Galajda Z, Cseppento Á, Gesztelyi R, Susán Z, Hegyi B, Nánási PP. The Janus face of adenosine: antiarrhythmic and proarrhythmic actions. *Curr Pharm Des.* 2015; 21(8): 965-76. doi:10.2174/1381612820666141029100346
75. Tabrizchi R, Bedi S. Pharmacology of adenosine receptors in the vasculature. *Pharmacol Ther.* 2001; 91(2): 133-147. doi:10.1016/s0163-7258(01)00152-8
76. Timmis A, Vardas P, Townsend N, Torbica A, Katus H, De Smedt D, Gale CP, Maggioni AP, Petersen SE, Huculeci R, Kazakiewicz D, de Benito Rubio V, Ignatiuk B, Raisi-Estabragh Z, Pawlak A, Karagiannidis E, Treskes R, Gaita D, Beltrame JF, McConnell A, Bardinet I, Graham I, Flather M, Elliott P, Mossialos EA, Weidinger F, Achenbach S; Atlas Writing Group, European Society of Cardiology. European Society of

Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021. *Eur Heart J.* 2022; 43(8): 716-799. doi:10.1093/eurheartj/ehab892.

77. Viczjan G, Erdei T, Ovari I, Lampe N, Szekeres R, Bombicz M, Takacs B, Szilagyi A, Zsuga J, Szilvassy Z, Juhasz B, Gesztelyi R. A Body of Circumstantial Evidence for the Irreversible Ectonucleotidase Inhibitory Action of FSCPX, an Agent Known as a Selective Irreversible A1 Adenosine Receptor Antagonist So Far. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(18): 9831. doi:10.3390/ijms22189831

78. Viczjan G, Szilagyi A, Takacs B, Ovari I, Szekeres R, Tarjanyi V, Erdei T, Teleki V, Zsuga J, Szilvassy Z, Juhasz B, Varga B, Gesztelyi R. The effect of a long-term treatment with cannabidiol-rich hemp extract oil on the adenosinergic system of the zucker diabetic fatty (ZDF) rat atrium. *Front Pharmacol.* 2022; 13: 1043275. doi:10.3389/fphar.2022.1043275

79. Vincenzi F, Pasquini S, Contri C, Cappello M, Nigro M, Travagli A, Merighi S, Gessi S, Borea PA, Varani K. Pharmacology of Adenosine Receptors: Recent Advancements. *Biomolecules.* 2023; 13: 1387. doi:10.3390/biom13091387

80. WHO. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death> (letöltve 2024. július 23-án)

81. Yang X, Heitman LH, IJzerman AP, van der Es D. Molecular probes for the human adenosine receptors. *Purinergic Signal.* 2021; 17(1): 85-108. doi:10.1007/s11302-020-09753-8

82. Yegutkin GG, Boison D. ATP and Adenosine Metabolism in Cancer: Exploitation for Therapeutic Gain. *Pharmacol Rev.* 2022; 74(3): 797-822. doi:10.1124/pharmrev.121.000528

83. Zhang Y, Wernly B, Cao X, Mustafa SJ, Tang Y, Zhou Z. Adenosine and adenosine receptor-mediated action in coronary microcirculation. *Basic Res Cardiol.* 2021; 116(1): 22. doi:10.1007/s00395-021-00859-7

84. Zsuga J, Erdei T, Szabo K, Lampe N, Papp C, Pinter A, Szentmiklosi AJ, Juhasz B, Szilvassy Z, Gesztelyi R. Methodical Challenges and a Possible Resolution in the Assessment of Receptor Reserve for Adenosine, an Agonist with Short Half-Life. *Molecules.* 2017; 22(5): 839. doi:10.3390/molecules22050839



Nyilvántartási szám: DEENK/427/2024.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Óvári Ignác

Doktori Iskola: Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori Iskola. Táplálkozástudományi Doktori Program

MTMT azonosító: 10083856

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Óvári, I.**, Viczján, G., Bege, M., Borbás, A., Herczegh, P., Zsuga, J., Papp, Z., Szilvássy, Z., Juhász, B., Gesztelyi, R., Erdei, T. D.: The ex vivo effects of hypoxanthine-tricyclano, a synthetic adenosine analogue, on rat left and right atria.  
*Gen. Physiol. Biophys.* "Accepted by Publisher", 2024.  
IF: 1.3 (2023)
2. **Óvári, I.**, Viczján, G., Erdei, T. D., Takács, B., Tarjányi, V., Zsuga, J., Szűcs, M., Szilvássy, Z., Juhász, B., Gesztelyi, R.: The influence of the way of regression on the results obtained by the receptorial responsiveness method (RRM), a procedure to estimate a change in the concentration of a pharmacological agonist near the receptor.  
*Front. Pharmacol.* 15, 1-18, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2024.1375955>  
IF: 4.4 (2023)

### További közlemények

3. Viczján, G., **Óvári, I.**, Erdei, T. D.: A kannabidiol és az adozinerg rendszer kapcsolata.  
*Eü. Innov. Szle.* 2 (2), 8-13, 2023.
4. **Óvári, I.**, Szilágyi, V., Viczján, G., Lampé, N., Bege, M., Borbás, A., Herczeg, P., Juhász, B., Gesztelyi, R., Erdei, T. D.: Egy újonnan szintetizált adozin analóg, a hipoxantín-triciklánó hatása izolált patkány bal és jobb pitvaron.  
*Eü. Innov. Szle.* 1 (1), 9-16, 2022.





5. Viczján, G., Szilágyi, A. T., Takács, B., **Óvári, I.**, Szekeres, R., Tarjányi, V., Erdei, T. D., Teleki, V., Zsuga, J., Szilvássy, Z., Juhász, B., Varga, B., Gesztelyi, R.: The effect of a long-term treatment with cannabidiol-rich hemp extract oil on the adenosinergic system of the Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rat atrium.  
*Front. Pharmacol.* 13, 1-12, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2022.1043275>  
IF: 5.6
6. Viczján, G., Erdei, T. D., **Óvári, I.**, Lampé, N., Szekeres, R., Bombicz, M., Takács, B., Szilágyi, A. T., Zsuga, J., Szilvássy, Z., Juhász, B., Gesztelyi, R.: A Body of Circumstantial Evidence for the Irreversible Ectonucleotidase Inhibitory Action of FSCPX, an Agent Known as a Selective Irreversible A1 Adenosine Receptor Antagonist So Far.  
*Int. J. Mol. Sci.* 22 (18), 1-21, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22189831>  
IF: 6.208
7. Pleszkó, A., Pauleczki, A., **Óvári, I.**, Óvári, J., Hauser, P.: Isolated Hallucination as a Consequence of SARS-CoV-2 Infection in a 10-year-old Child.  
*Clin Child Psychol Psychiatry.* 27 (1), 238-243, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/13591045211061805>

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 17,508**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
5,7**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2024.08.22.



## 9. Tárgyszavak

**Magyar tárgyszavak:** adenzin; hipoxantin-triciklánó; CPX; CPA; NECA; CHA; patkány; tengerimalac; szív; pitvar; *ex vivo*; *in silico*; A<sub>1</sub> adenzin receptor; inotrop hatás; chronotrop hatás; intersticiális koncentráció; RRM; individuális illesztés; globális illesztés

**Angol tárgyszavak:** adenosine; hypoxanthine-tricyclano; CPX; CPA; NECA; CHA; rat; guinea pig; heart; atrium; *ex vivo*; *in silico*; A<sub>1</sub> adenosine receptor; inotropic effect; chronotropic effect; interstitial concentration; RRM; local fitting; global fitting

## 10. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Szilvássy Zoltán egyetemi tanár, intézetigazgató, rektor bizalmát, ami biztosította számomra, hogy munkámat a DE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetben végezhettem.

Köszönöm Dr. Gesztelyi Rudolf egyetemi tanár, témavezetőm segítőkészségét és baráti támogatását munkám során.

Köszönetet mondok munkacsoportom tagjainak is a sok segítségért: Dr. Erdei Tamás és Dr. Viczján Gábor tudományos segédmunkatársaknak, valamint Juhászné Oláh Ildikó és Dávid Anna Mária asszisztenseknek.

Köszönöm intézetünk minden dolgozójának a segítségét, különösen Dr. Juhász Béla egyetemi tanárnak, Dr. Kiss Rita egyetemi adjunktusnak, Kerekes Judit és Demjén Krisztina titkárnőknek, Szalai Andrea doktori iskola adminisztrátornak, továbbá Dr. Bernát Brigitta, Dr. Szekeres Réka, Pelles-Taskó Beáta, Dr. Takács Barbara és Dr. Tarjányi Vera PhD hallgatóknak.

Köszönöm családomnak, hogy mindvégig mellettem álltak és támogattak, feleségemnek és gyermekünknek, édesanyámnak, édesapámnak és testvéreimnek.

PhD munkám anyagi feltételeit az alábbi pályázatok biztosították: TKP2020-NKA-04; TKP2021-EGA-18; ÚNKP-23-3-II-DE-85; GINOP-2.3.4-15-2016-00002; Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar (tudományfinanszírozás).

## 11. Függelék – az RRM szoftverbe írható modelljei

Itt az egyenleteket úgy mutatom be, ahogyan azokat a görbeillesztő szoftverben használtuk (Curve Fitting Guide, 2024). Ennek megfelelően a független és a függő változó itt X és Y (míg máshol logc és E vagy E’).

Hill-modellként a szoftver beépített „sigmoidal dose-response (variable slope)” egyenletét használtuk, nulla értéken rögzített „bottom” paraméterrel (Curve Fitting Guide, 2024) (lásd a 7. egyenletet):

$$Y = E_{\max} / (1 + 10^{(n \cdot (\log EC_{50} - X))})$$

A 9., 10. és 11. egyenlet individuális és egymodelles globális illesztésre készült alakjai:

$$Y = 100 - 100 \cdot (100 - E_{\max} \cdot (cx + 10^X)^n / ((cx + 10^X)^n + 10^{(n \cdot \log EC_{50})})) / (100 - E_{\max} \cdot cx^n / (cx^n + 10^{(n \cdot \log EC_{50})}))$$

és

$$Y = 100 - 100 \cdot (100 - E_{\max} / (1 + 10^{(n \cdot (\log EC_{50} - \log(cx + 10^X))})) / (100 - E_{\max} / (1 + 10^{(n \cdot (\log EC_{50} - \log(cx))}))$$

és

$$Y = 100 - 100 \cdot (100 - E_{\max} / (1 + 10^{(n \cdot (\log EC_{50} - \log(10^{\log cx} + 10^X))})) / (100 - E_{\max} / (1 + 10^{(n \cdot (\log EC_{50} - \log cx))}))$$

A 7. egyenlettel együtt használt 9., 10. és 11. egyenlet, mint többsoros modellek („multiline models”), melyek kétmodelles globális illesztésre készültek:

$$\text{Hill} = E_{\max} / (1 + 10^{(n \cdot (\log EC_{50} - X))})$$

$$\text{RRM} = 100 - 100 \cdot (100 - E_{\max} \cdot (cx + 10^X)^n / ((cx + 10^X)^n + 10^{(n \cdot \log EC_{50})})) / (100 - E_{\max} \cdot cx^n / (cx^n + 10^{(n \cdot \log EC_{50})}))$$

$$\langle A \rangle Y = \text{Hill}$$

$$\langle \sim A \rangle Y = \text{RRM}$$

továbbá

$$\text{Hill} = \text{Emax} / (1 + 10^{(n * (\log \text{EC50} - X))})$$

$$\text{RRM} = 100 - 100 * (100 - \text{Emax} / (1 + 10^{(n * (\log \text{EC50} - \log(\text{cx} + 10^X))})) / (100 - \text{Emax} / (1 + 10^{(n * (\log \text{EC50} - \log(\text{cx}))}))$$

$$\langle A \rangle Y = \text{Hill}$$

$$\langle \sim A \rangle Y = \text{RRM}$$

valamint

$$\text{Hill} = \text{Emax} / (1 + 10^{(n * (\log \text{EC50} - X))})$$

$$\text{RRM} = 100 - 100 * (100 - \text{Emax} / (1 + 10^{(n * (\log \text{EC50} - \log(10^{\log \text{cx}} + 10^X))})) / (100 - \text{Emax} / (1 + 10^{(n * (\log \text{EC50} - \log \text{cx}))}))$$

$$\langle A \rangle Y = \text{Hill}$$

$$\langle \sim A \rangle Y = \text{RRM}$$

## **12. Függelék – az értekezés alapjául szolgáló közlemények**