

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Erdei Tamás Dániel

**A pitvari A<sub>1</sub> adenzin receptor által mediált  
direkt negatív inotróp hatáshoz tartozó receptor  
rezerv meghatározásának új módszere**

DEBRECENI EGYETEM  
KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA  
DEBRECEN, 2021.

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A pitvari A<sub>1</sub> adenozin receptor által mediált  
direkt negatív inotróp hatáshoz tartozó receptor  
rezerv meghatározásának új módszere**

Dr. Erdei Tamás Dániel

TÉMAVEZETŐ: Dr. Gesztelyi Rudolf



DEBRECENI EGYETEM  
KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA  
DEBRECEN, 2021.

*Aki nem érzi fontosnak, hogy értékeset alkosson, az rabszolga, még ha a saját piramisát építi is.*

*Németh László*

*(után szabadon)*

# Tartalomjegyzék

<b>1. Bevezetés és célkitűzés.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Irodalmi áttekintés .....</b>	<b>6</b>
2.1. A purinerg transzmisszió .....	6
2.2. Az adenzin szintézise, metabolizmusa, receptorai .....	7
2.6. A pitvari A <sub>1</sub> adenzin receptor által mediált negatív inotróp hatás.....	10
2.3. Az alkalmazott A <sub>1</sub> adenzin receptor ligandok .....	11
2.4. A receptor rezerv .....	13
2.5. Az A <sub>1</sub> adenzin receptor rezerv .....	16
2.7. Az alkalmazott kvantitatív modellek.....	17
2.7.1. A Hill egyenlet .....	17
2.7.2. Az agonizmus operatív modellje .....	20
2.7.3. A receptoriális válaszkészség módszer (RRM).....	22
2.7.4. Az RRM szerepe az adenzinra vonatkozó receptor rezerv meghatározásában	25
<b>3. Anyagok és módszerek .....</b>	<b>27</b>
3.1. <i>In silico</i> módszerek.....	27
3.1.1. A szimulálandó biológiai modell tulajdonságai .....	27
3.1.2. Alkalmazott matematikai eszközök.....	29
3.1.3. Első lépés: egyszerű, torzítatlan E/c görbék szimulációja és elemzése.....	31
3.1.4. Második lépés: torzítatlan hatás értékek kiszámítása egy későbbi torzító transzformációhoz .....	32
3.1.5. Harmadik lépés: torzult E/c görbék létrehozása és elemzése .....	33
3.1.6. Negyedik lépés: korrigált E/c görbék létrehozása az A agonista torzult E/c görbéiből.....	34
3.1.7. Számítógépes szimuláció és adatelemzés.....	35
3.2. <i>Ex vivo</i> módszerek .....	36
3.2.1. Vegyszerek és oldatok.....	36
3.2.2. Állatok és preparátumok.....	36
3.2.1. Kísérleti protokollok és csoportok.....	37
3.2.4 Az E/c görbék kiértékelése .....	38
3.2.5. A CPA E/c görbék NBTI okozta torzulásának kvantifikálása .....	39
3.2.6. Az adenzin E/c görbék NBTI miatt torzult hatás értékeinek korrekciója a régi módszerrel .....	39
3.2.7. Az adenzin E/c görbék NBTI miatt torzult hatás értékeinek korrekciója az új	

módszerrel .....	40
3.2.8. Adatelemzés .....	41
<b>4. Eredmények .....</b>	<b>43</b>
4.1. <i>In silico</i> eredmények.....	43
4.1.1. Az A és B agonisták egyszerű, torzítatlan E/c görbéinek jellemzői.....	43
4.1.2. Az önmagában alkalmazott TI kezelés, valamint az IA-val és TI-vel való együttes kezelés hatása az A agonista E/c görbéjére .....	44
4.1.3. A TI kezelés hatása a B agonista E/c görbéjére .....	45
4.1.4. Az A agonista korigált E/c görbéi.....	45
4.2. A tengerimalac pitvaron végzett <i>ex vivo</i> kísérletek eredményei .....	48
4.2.1. A kezeletlen (kontroll) adеноzin és CPA E/c görbék.....	48
4.2.2. A CPA E/c görbék a P1 és P2 csoportokban.....	49
4.2.3. Adеноzin E/c görbék a P3 és P4 csoportokban .....	52
4.2.4. Az FSCPX előkezelés és az NBTI kezelés interferenciája .....	53
4.2.5. Az NBTI jelenlétében felvett adеноzin E/c görbék korigált hatásai.....	53
<b>5. Megbeszélés .....</b>	<b>56</b>
5.1. Az <i>in silico</i> következtetések .....	56
5.2. Az <i>ex vivo</i> következtetések.....	59
<b>6. Az új eredmények összefoglalása .....</b>	<b>66</b>
<b>7. Summary of the findings.....</b>	<b>67</b>
<b>8. Irodalom .....</b>	<b>68</b>
8.1. A disszertáció elkészítéséhez felhasznált irodalom.....	68
8.2. A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények .....	78
<b>9. Tárgyszavak .....</b>	<b>81</b>
<b>10. Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>82</b>

# 1. Bevezetés és célkitűzés

PhD munkám során a munkacsoportunk által korábban kifejlesztett, az A<sub>1</sub> adozin receptor (A<sub>1</sub> receptor) adozinra vonatkozó receptor rezervjét kvalitatíve meghatározni képes módszert validáltam számítógépes szimulációs eljárással, majd a vizsgálat eredményei alapján megfogalmazott új hipotézisünket teszteltem egy izolált tengerimalac bal pitvaron végzett vizsgálattal. Az alkalmazott kísérleti elrendezés korábbi fejlesztés eredménye volt (Kiss és mtsai, 2013), melynek során munkacsoportunknak először sikerült meghatározni az adozin, mint gyorsan metabolizálódó endogén agonista a receptor rezervjét a tengerimalac bal pitvaron mért direkt negatív inotróp hatás tekintetében (vagyis ami előzetes β-adrenerg stimuláció nélkül váltható ki).

A receptor rezerv egy agonista és a hozzá tartozó receptoriális rendszer kapcsolódásának válasz-indukáló képességét jellemzi. Receptor rezerről akkor beszélünk, ha az adott agonista az adott szöveten az összesnél kevesebb (vagyis szubmaximális mennyiségű) receptor ingerlésével is ki tudja váltani a maximális hatást (Ruffolo, 1982; Giraldo és mtsai, 2002; Dhalla és mtsai, 2003; Kenakin, 2018). A receptor rezerv megítélése során három dolgot kell figyelembe venni: az egyik az agonista, a másik az adott szövetre jellemző receptoriális rendszer (receptor sűrűség, jelátviteli útvonalak), a harmadik pedig a kiváltott hatás jellege (Brown és Goldstein, 1986; Srinivas és mtsai, 1997). Veszünk tehát egy agonistát és egy szövetet (ami tartalmazza a megfelelő receptort), kiválasztjuk a mérendő hatást, majd megválasztjuk a módszert, amivel a receptor rezervet meg akarjuk határozni. Koncentráció-hatás (E/c) görbét veszünk fel először az eredeti receptorszám mellett, majd az ingerelhető receptorok számának irreverzibilis csökkentése után. Az így nyert adatokból meghatározható az adott módszerrel az adott agonistára, szövetre és hatásra jellemző receptor rezerv. A receptor rezervre vonatkozó információk megszerzése hasznos a különböző agonisták által kiváltott különböző hatások mértékének előrejelzésében. Ha a receptor rezerv kicsi, kizárólag a nagy hatékonyságú agonisták váltanak ki érdemleges választ, míg nagy receptor rezerv esetén a parciális agonisták is maximális(hoz közeli) hatást eredményeznek (Albrecht-Küpper és mtsai, 2012; Greene és mtsai, 2016).

A munkacsoportunk egy korábbi tanulmányában meghatározta a NECA (5'-(N-ethylcarboxamido)adenosine), a CPA (N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine) és a CHA (N<sup>6</sup>-cyclohexyladenosine) (három szintetikus, hosszú félélet-idejű A<sub>1</sub> receptor agonista) által kiváltott direkt negatív inotróp hatáshoz tartozó receptor rezervet tengerimalac bal pitvaron

(Gesztelyi és mtsai, 2013). Ezen kísérlet során FSCPX (8-cyclopentyl-N<sup>3</sup>-[3-(4-(fluorosulfonyl)benzoxyloxy)propyl]-N<sup>1</sup>-propylxanthine; irreverzibilis A<sub>1</sub> receptor antagonist) hiányában és jelenlétében kerültek felvételre az E/c görbék a három agonistával. Az FSCPX-et kifejlesztése után (Scammels és mtsai; 1994) számos vizsgálatban használták szelektív és irreverzibilis A<sub>1</sub> receptor antagonistaként (Srinivas és mtsai, 1996, 1997; Morey és mtsai; 1998; Baker és mtsai; 2000; Lorenzen és mtsai, 2002; Bozarov és mtsai, 2009; Gesztelyi és mtsai, 2013; Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai; 2014). Stabil, szintetikus full agonisták (például CPA) esetén az A<sub>1</sub> receptor rezerv sikeresen meghatározható volt az agonizmus operatív modelljével és a Furchgott módszerrel, melyek kvantitatív eredményt adnak. A munkacsoport a három vizsgált agonistával nagy A<sub>1</sub> receptor rezerv értékeket határozott meg a direkt negatív inotróp hatás tekintetében (Gesztelyi és mtsai, 2013).

A Furchgott módszer szerint az FSCPX az A<sub>1</sub> receptorok körülbelül 80–90%-át inaktíválta. Az FSCPX ugyanakkor csak jobbra tolódást eredményezett az agonisták E/c görbéjén, mintha az FSCPX kompetitív antagonistá lenne (Gesztelyi és mtsai, 2013). E vizsgálat során azonban nem sikerült meghatározni az adenzin (mint fiziológiás agonista) A<sub>1</sub> receptor rezervjét az általa kiváltott direkt negatív inotróp hatás tekintetében sem az operatív modellel, sem Furchgott módszerével. Ezt valószínűleg az adenzin túl rövid felezési ideje okozta (az adott *ex vivo* kísérleti elrendezés idő-viszonyaihoz képest), ami lehetetlenné tette az adenzin E/c görbéinek szaturációját (Gesztelyi és mtsai, 2013). Ezen okból kifolyólag a receptor rezerv meghatározása komoly kihívást jelent gyorsan metabolizáló agonisták, mint például az adenzin esetében.

Az adenzin a purin metabolizmusának ubikviter molekulája, ezért számos enzim és carrier szubsztrátja. Az A<sub>1</sub> receptor az ősi és mindenütt jelen lévő, G-proteinhez kapcsolt adenzin receptor család tagja, amely szinte minden szövetben komplex szabályozó funkciókat lát el (Burnstock és mtsai, 2010; Burnstock és Pelleg; 2015; Fredholm és mtsai, 2019). Az adenzin receptorok széles körű előfordulása, valamint a receptorok kötőhelyének sejten kívülről való megközelíthetősége miatt az extracelluláris adenzin koncentráció központi szerepet játszik a szervezet funkcióinak szabályozásában (elsősorban kóros viszonyok közepette). Szöveti károsodás és metabolikus stressz során az extracelluláris adenzin koncentráció megnő, ezzel összhangban az adenzin receptorok elsősorban védő és regeneráló hatásokat közvetítenek, részt vesznek számos betegség lefolyásának modulálásában (Fredholm és mtsai, 2001, 2011b; Burnstock és Pelleg, 2015; Peleli és mtsai, 2017). A cardiomyocyták fő adenzin receptor típusa az A<sub>1</sub> receptor, ami gyors és erős kardioprotektív hatásokat (melyek korlátozzák az energiafogyasztást, pl. negatív inotróp

hatás), valamint adaptív folyamatokat (pl. ischaemiás prekondicionálás) indít be (Headrick és mtsai, 2003, 2011, 2013; Lasley, 2018; Fredholm és mtsai; 2019). Ezért fontos megvizsgálni az adozin pontos szerepét az  $A_1$  receptor közvetítette adozinerg mechanizmusokban az egész szervezetre nézve, melyhez pontos és megbízható E/c adatok szükségesek.

A receptor rezerv meghatározására használt összes kvantitatív módszer alapja precíz E/c görbék meghatározása, ami azt jelenti, hogy az E/c görbe felépítésekor lehetőleg egyensúlyi állapot álljon fent az agonista és a receptor között, ez azonban rövid félélet-idejű agonisták esetén nehezen teljesíthető. Ezen kívül a valós receptorkörnyéki adozin-szintet nehéz kiszámítani vagy mérni, mivel a legtöbb szövet, beleértve a myocardiumot is, gyorsan eliminálja az adozint (Karsai és mtsai, 2006; Ramakers és mtsai, 2008). Noha az E/c görbék meghatározásához használt exogén adozin gyors eliminációja gátolható, a gátlás miatti endogén adozin akkumuláció torzíthatja az eredményt. A probléma megoldására munkacsoportunk olyan eljárást fejlesztett ki, melynek segítségével ez a torzulás matematikailag korrigálható, majd kvalitatív módon a receptor rezerv meghatározható (Kiss és mtsai, 2013). Az új eljárás alapja a receptorális válaszkészség módszer (RRM), amelyet munkacsoportunk korábban azért fejlesztett ki, hogy (bizonyos körülmények között) mennyiségileg meghatározhatóvá váljon egy agonista koncentrációja a receptorok mikro környezetében (Gesztelyi és mtsai, 2004; Greczer és mtsai, 2010a, 2010b).

A receptor rezerv meghatározásra kifejlesztett korábbi módszerekkel (Morey és mtsai, 1998; Srinivas és mtsai, 1997; Gesztelyi és mtsai, 2013) ellentétben tehát a munkacsoport nitrobenzylthioinosine (NBTI) alkalmazását vezette be a kísérleti protokollba. Az NBTI az ekvilibratív és NBTI-érzékeny nukleozid transzporter (ENT1 avagy SLC29A1) szelektív inhibitora (Thorn és Jarvis, 1996). Mivel a fiziológiás adozin transzport a sejtekbe irányul (Deussen és mtsai; 1999, 2006; Karsai és mtsai, 2006), az NBTI megakadályozza az E/c görbe felvétele során beadott adozin felvételét és intracelluláris eliminációját, elegendő időt hagyva az exogén adozinnak a hatás kifejtésére. A módszer megoldandó hátulütője, hogy az NBTI megakadályozza az endogén adozin sejtekbe jutását és intracelluláris eliminációját is, ami az interstitialis adozin koncentráció növekedéséhez vezet. Fontos szempont, hogy ez utóbbi jelenség már az adozin E/c görbe felvétele előtt megtörténik (és természetesen a kísérlet során végig fennáll, amíg az NBTI jelen van). Mivel az NBTI által felhalmozott többlet endogén adozin még az E/c görbe felvétele előtt elhasználja az  $A_1$  receptorok (és a jelátvitelük) válaszképességének egy részét, az exogén adozinra adott válasz, pontosabban, amit az E/c görbe mutat, csökken. Ezért az NBTI

jelenlétében generált adenzin E/c görbék hatás (y) értékeit korrigálni kell arra a torzító hatásra, amelyet az interstitiumbeli többlet endogén adenzin okoz. Ez úgy történik, hogy az RRM-mel meghatározzuk a többlet interstitialis adenzin egyenértékét (ha CPA-t használunk a többlet endogén adenzin meghatározásához felvett E/c görbékhez, az ekvielektív CPA koncentrációt), majd az RRM egyenletéből kiindulva meghatározzuk a kérdéses torzult E/c görbe torzítatlan hatás értékeit. Ez a rekonstruált E/c görbe jellegzetes módon az endogén többlet adenzin hatásával indul (ami 10  $\mu$ M NBTI jelenléte esetén eleve jelentős érték). Amennyiben a rövid féléletidejű adenzin NBTI mellett felvett E/c görbét korrigáljuk, a rekonstruált E/c görbe x tengelyén – információ híján – csak az exogén adenzin koncentrációja tüntethető fel. A korrigált görbéről leolvasható maximális hatás érték azonban korrekt lesz, ennek irreverzibilis antagonist okozta csökkenése – vagy ennek hiánya – ránézésre megállapítható, vagyis a receptor rezerv megléte – vagy hiánya – kvalitatíve kimondható (Kiss és mtsai, 2013).

Az adenzin E/c görbék felvételekor FSCPX-et használtunk, mint irreverzibilis A<sub>1</sub> receptor antagonistát, hasonlóan a stabil agonisták receptor rezervjének meghatározásához. Velük ellentétben azonban az adenzin E/c görbék felvétele NBTI jelenlétében kell történnjen. A receptor rezerv kvalitatív módszerrel történő meghatározásának folyamata során munkacsoportunk azt a meglepő jelenséget tapasztalta, hogy NBTI jelenlétében az FSCPX előkezelés növelni látszott az adenzinra adott választ (az FSCPX+NBTI kezelt adenzin E/c görbék összehasonlításakor a kizárólag NBTI kezelt adenzin E/c görbével). Ezt a farmakológiai paradoxont ekkor a munkacsoport azzal magyarázta, hogy az FSCPX (mint irreverzibilis A<sub>1</sub> receptor antagonist) gátolta a többlet interstitialis endogén adenzin A<sub>1</sub> receptorra kifejtett hatását, így részben kivédte a többlet endogén adenzin okozta torzulást (még mielőtt az exogén adenzint a rendszerbe juttattuk volna) (Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014).

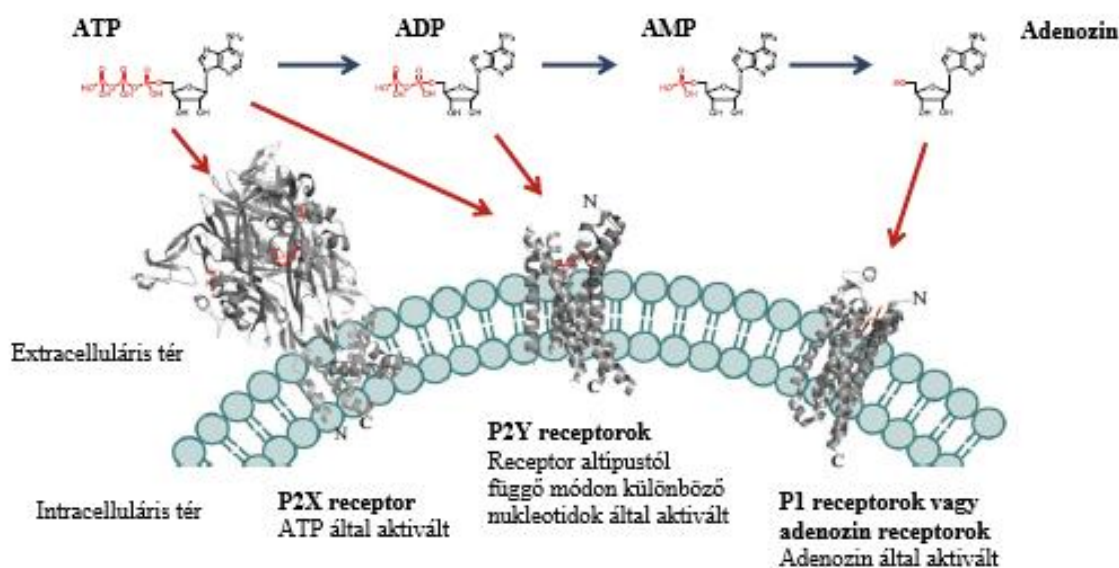
PhD munkám első célja az volt, hogy *in silico* módszerekkel validáljam az adenzin receptor rezerv mérésére korábban kifejlesztett módszert (Kiss és mtsai, 2013). Ehhez a munkacsoport egy korábbi vizsgálatának *ex vivo* felvett E/c görbéit használtuk fel (Pák és mtsai, 2014). A szimuláció során arra törekedtünk, hogy az *in silico* E/c görbék alakja és lefutása az eredeti *ex vivo* E/c görbékéhez minél hasonlóbb legyen. Az egyértelműség kedvéért (vagyis hogy ránézésre eldönthető legyen, hogy az *ex vivo* vagy az *in silico* vizsgálatról van-e szó) az eredeti E/c görbékhez használt adenzint és CPA-t a szimulált görbék esetében A és B agonistának neveztük, míg az FSCPX-et és az NBTI-t mint irreverzibilis antagonistát (IA) és transzport inhibitor (TI) tüntettük fel. Az *in silico* vizsgálat

során azonban – nem várt módon – interakció gyanúja merült fel az FSCPX és az NBTI között. Emiatt PhD munkám második célja egy olyan *ex vivo* vizsgálat megtervezése és kivitelezése lett, amelyben ez az esetleges interakció megerősíthető vagy kizárható.

## 2. Irodalmi áttekintés

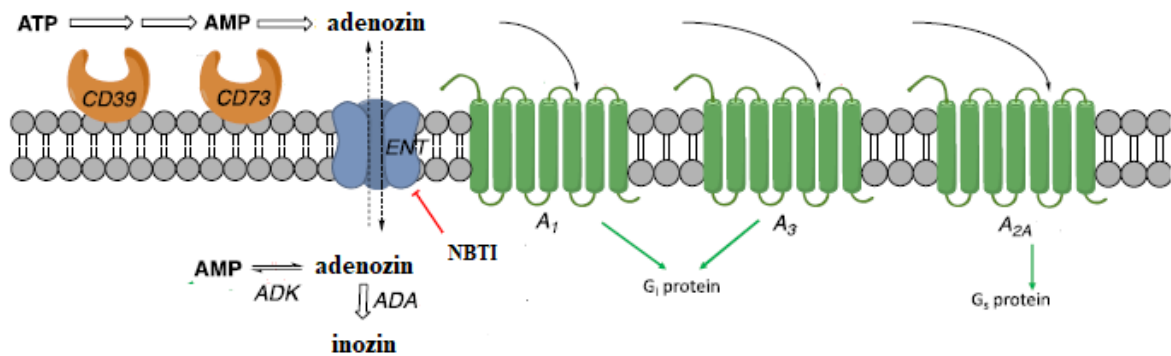
### 2.1. A purinerg transzmisszió

A purinerg jelátvitelben szerepet játszó receptorokat két részre osztják és P1, illetve P2 receptor családnak nevezik (1. ábra) (Burnstock, 2007). A P1 vagy adenozin receptorokon belül a Nemzetközi Farmakológiai Társaság (IUPHAR) négy altípust különböztet meg: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> és A<sub>3</sub>, melyek mind G-protein kapcsolt receptorok (2. ábra) (Fredholm és mtsai, 2011a, 2019; Alexander és mtsai, 2011). A P2 csoport (nukleotid receptorok) tovább osztható a P2Y és P2X receptor családokra (1. ábra) (Abbracchio és mtsai, 2006; Khakh és mtsai, 2001; Jacobson és Müller, 2016). A P2Y család nyolc különböző G-fehérjéhez kapcsolt receptor típust foglal magába és mindegyik saját agonista profillal rendelkezik: P2Y1 (ADP által aktivált), P2Y2 (ATP, UTP), P2Y4 (UTP), P2Y6 (UDP), P2Y11 (ATP), P2Y12 (ADP), P2Y13 (ADP) és P2Y14 (UDP, UDP-glükóz, UDP-galaktóz) (Rafehi és mtsai, 2018). A P2X család homotrimer vagy heterotrimer ATP-kapuzott ioncsatorna receptorokat ölel fel. A család tagjai hét különböző alegység (P2X1 - P2X7) kombinációiból állnak (Khakh és mtsai, 2001; Habermacher és mtsai, 2016). Metabolikus kapcsolat van a P1 és P2 receptor agonisták között, mivel a nukleotidokat ektonukleotidázok nukleozidokká (pl. adenzinná) hidrolizálják (1. ábra).



1. ábra. Purinoreceptorok és endogén ligandjaik (Müller és mtsai, 2020)

A purinerg rendszert a legszéleskörűbb autokrin és parakrin jelátvitelnek tekintik, mivel a purinoreceptorokat minden főbb szövettípusban azonosították és olyan változatos folyamatokban vesznek részt, mint a szekréció, a sejtek szaporodása, sejthalál, immunválaszok, gyulladás, fájdalom, vazoreguláció és a hemosztázis. A purinoreceptorok olyan sok élettani és kóros folyamatot szabályoznak, hogy a tudományos világ is felfigyelt rájuk és gyógyszer-targetként vizsgálták őket. Többről kiderült, hogy klinikailag is fontos szerepet játszanak (Herbert és Savi, 2003). A purinoreceptorok filogenetikailag ősi, ennek megfelelően a humán szöveteken túl megtalálhatóak minden laboratóriumban használt szervezetben: egér, patkány, csirke, *Xenopus laevis*, zebrahal, sőt amőbában is (Fountain és mtsai, 2007; Burnstock, 2007). Az adenzin receptorok aktiválódása stabilizálja az adott szövet energiaháztartását, csökkenti a szöveti károsodást és a remodellinget, így az adenzin receptorok vizsgálata nagy jelentőséggel bír. Nem kivétel ez alól a cardiovascularis farmakológia sem, ahol egyre több adenzin receptor agonistát fejlesztenek ki és folyamatosan zajlik az új indikációs lehetőségek keresése (Müller és Jacobson, 2011; Szentmiklósi és mtsai, 2011a; Headrick és mtsai, 2011; Albrecht-Küpper és mtsai, 2012; Burnstock, 2017; Geldenhuys és mtsai 2017; Deb és mtsai 2019; Jacobson és mtsai, 2019; Borah és mtsai 2019; Jacobson és Reitman, 2020).



2. ábra. Az adenzin metabolizmusa, transzportja és három legfontosabb receptora (Jacobson és Reitman, 2020)

## 2.2. Az adenzin szintézise, metabolizmusa, receptorai

Az adenzin egy természetes purin-nukleozid, amelyben a nukleobázis az adenin,

melyhez glikozidos kötéssel egy ribóz kapcsolódik. Az adenzin fiziológias körülmények között folyamatosan termelődik, de nem túl nagy mennyiségben (Shryock és Belardinelli, 1997; Fredholm és mtsai, 2001). Az adenzin fontos jelzőmolekulája a szervezet energiaforgalmában bekövetkező változásoknak, hiszen az ATP (a fő energiahordozó molekula) metabolitja. Az intracelluláris ATP elengedhetetlen forrása az energiaigényes folyamatoknak, például az aktív transzportnak, a bioszintézisek jelentős részének, a sejtek mozgásának és az ingerlékeny sejtek membránpotenciáljának (Yegutkin és mtsai, 2008). Ha felborul az egyensúly az ATP előállítása és felhasználása között, például a sejtek kimerülése, hypoxia és ischaemia során, az adenzin felhalmozódik (Saito és mtsai, 1999; Camici és mtsai, 2018).

Az adenzin előállítása történhet mind az intracelluláris, mind az extracelluláris térben. A sejten belül főleg ATP, ADP, AMP és cAMP enzimátikus bontásából keletkezik, melyeket endo-5'-nukleotidázok és egyéb alkalikus foszfatázok hajtanak végre. Adenzin intracellulárisan keletkezik S-adenozil-homociszteinből (SAH) az intracelluláris S-adenozil-L-homocisztein-hidroláz enzim révén (Reiss és mtsai, 2019). Extracellulárisan adenzin az ekto-5'-nukleotidázok és az ekto-apirázok működésének köszönhetően jön létre ATP-ből. Az ekto-5' nukleotidázok közé tartozik a CD39 és CD73 enzim is. A CD39 ADP-n keresztül AMP-t állít elő, amit a CD73 képes adenzinná alakít (Maliszewski és mtsai, 1994; Kaczmarek és mtsai, 1996; Fredholm és mtsai, 2001, 2011b; Bono és mtsai, 2015; Borea és mtsai, 2018) (2. ábra).

Megfelelő szöveti energiaellátottág esetén az adenzin döntően AMP-vé alakul az adenzin-kináz (ADK) révén, kisebb részben inozinná bomlik adenzin dezamináz (ADA) közreműködésével (melynek van intracelluláris és extracelluláris formája is) (Antonoli és mtsai, 2007; Boison, 2013) (2. ábra). Az intracelluláris és az extracelluláris adenzin koncentráció egyensúlyban van, melyért különböző aktív és passzív transzporterek felelnek.

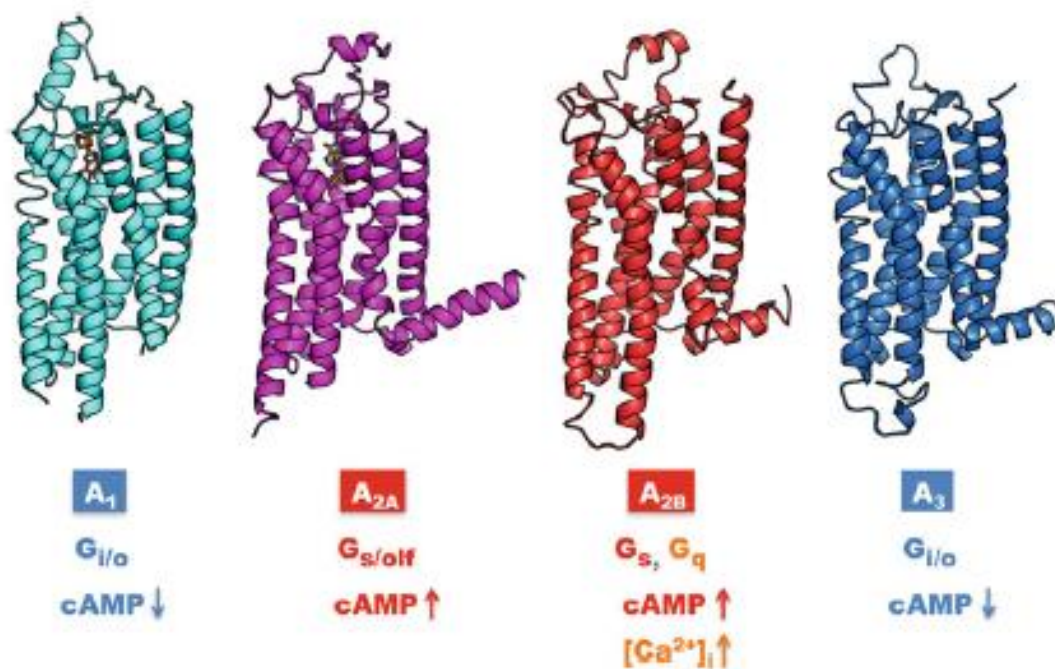
Az adenzin plazmamembránon keresztüli transzportjára az egyik lehetőséget a koncentratív nukleozid transzporterek (CNT1, CNT2, CNT3), a másikat az ekvibratív nukleozid transzporterek (ENT1, ENT2, ENT3) jelentik.

Az ENT-ek passzív kétirányú transzporterek, míg a CNT-k aktív, Na<sup>+</sup>-függő transzporterek. Döntően az ENT-ek felelősek az adenzin eloszlásáért az emlős szövetekben, a myocardiumban is elsősorban ezek találhatóak (Latini és mtsai, 2001; Blackburn és mtsai, 2009; Sheth és mtsai, 2014; Pastor-Anglada és Pérez-Torras, 2018). Az ENT1 a myocardium legjellemzőbb adenzin transzportere, szelektív gátlója az NBTI (Conant és Jarvis, 1991) (2. ábra). Ennek tükrében elmondhatjuk, hogy a cardiomyocyták nukleozid transzportját az

adenozin extra- és intracelluláris koncentráció különbsége határozza meg, ami fiziológias esetben a sejtbe irányul (Deussen és mtsai, 1999; Deussen, 2000a, 2000b).

Fiziológiásan az adenzin koncentrációja az emberi plazmában 0,1–1  $\mu\text{M}$ , felezési ideje nagyon rövid, 0,6 és 1,5 s között mozog (Ontyd és Schrader, 1984; Möser és mtsai, 1989). A rövid felezési idő alapja az adenzin gyors eliminációja az extracelluláris térből, amit a nukleozid transzporterek nagy kapacitása biztosít.

Az adenzin amellett, hogy az ATP metabolitja, az adenzin receptorok endogén agonistája is. A G-protein kapcsolt adenzin receptorok hét transzmembrán doménal rendelkeznek és négy altípusra osztották őket:  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  és  $A_3$  (Fredholm és mtsai, 2011b). Az  $A_1$  és  $A_3$  receptorok gátló ( $G_{i/o}$ ) G-proteinekhez kapcsolódnak, melyek aktivációja adenilát-cikláz gátlásához vezet. Ezzel szemben az  $A_{2A}$  és  $A_{2B}$  receptorok serkentő ( $G_s$ ) G-proteinhez kapcsolódva fokozzák az adenilát-cikláz működését (3. ábra). Az  $A_{2B}$  receptor ezenkívül sok sejtben a  $G_q$ -fehérjékhez kapcsolva foszfolipáz C aktivációhoz és ezt követő kalcium mobilizációhoz vezet. Érdeemes megjegyezni, hogy az  $A_1$  és az  $A_{2A}$  receptorok több nagyságrenddel nagyobb affinitást mutatnak az adenzinnal szemben, mint az  $A_3$  és az  $A_{2B}$  receptorok (Fredholm és mtsai, 2001, 2011a, 2011b; Cheng és mtsai, 2017).



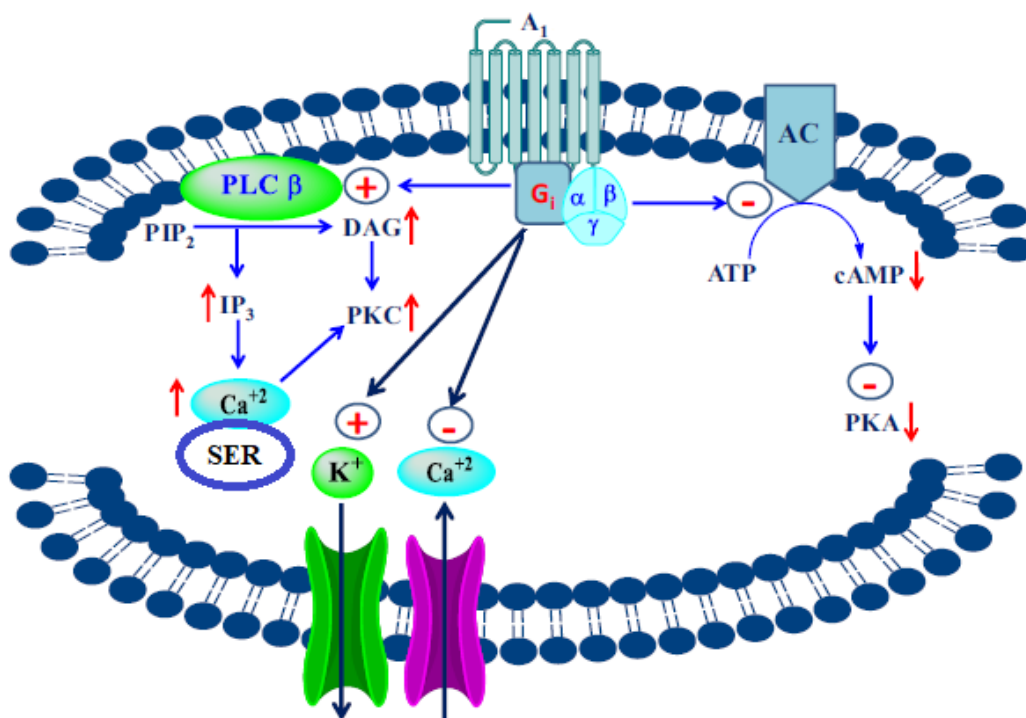
3. ábra. Az adenzin receptorok és a hozzájuk kapcsolódó G-proteinek (Müller és mtsai, 2020)

Az adenzin által létrehozott kardioprotektív és regeneratív hatások főleg  $A_1$  receptoron keresztül mediálódnak (Albrecht-Küpper és mtsai, 2012; Greene és mtsai 2016). A myocardialis  $A_1$  receptor izgatása következtében negatív tróp (inotróp, kronotróp, dromotróp és batmotróp) hatások érvényesülnek (Fredholm és mtsai 2001).

## 2.6. A pitvari $A_1$ adenzin receptor által mediált negatív inotróp hatás

Az pitvari  $A_1$  receptor által mediált direkt negatív inotrópia több szignalizációs útvonal eredőjeként jön létre. Az  $A_1$  receptor  $G_i$ -proteinhez kapcsolódva fokozza a befelé egyenirányító  $K^+$  csatornák (GIRK) nyitási frekvenciáját, valamint gátolja az adenilát-cikláz enzim működését. A  $K^+$  csatornák nyitása hiperpolarizálja a cardiomyocytákat, ami rövidíti az akciós potenciált, melynek következtében a platófázis alatt kevesebb  $Ca^{2+}$  jut a sejtbe (Kurachi és mtsai, 1986; Kirsch és mtsai 1990). Az adenilát-cikláz gátlása miatt csökken a cAMP szint, ami a cAMP-függő protein kináz aktivitását gátolja, melynek következménye a fokozott foszfolambán aktivitás és az L-típusú  $Ca^{2+}$  csatorna gátlása (Gupta és mtsai, 1993; Neumann és mtsai, 1995; Fenouillet és mtsai, 2019). Emellett a  $G_i$ -protein  $\beta\gamma$  alegysége képes aktiválni a foszfolipáz C-t is (PLC  $\beta$ ), ami növeli a diacilglicerin (DAG) és az inozitol-1,4,5-trifoszfát (IP3) koncentrációját. E hatások következtében a szarkoplazmatikus retikulum (SER)  $Ca^{2+}$ -ATP-ázának az aktivitása (SERCA) lecsökken, így gátlódik a  $Ca^{2+}$  visszavétel, ami a sejt  $Ca^{2+}$  veszteséhez vezet (4. ábra) (Biber és mtsai, 1997; Deb és mtsai 2019). Ez a  $Ca^{2+}$  veszteség, illetve a  $K^+$  csatornák nyitása által kialakult hiperpolarizáció okozza a pitvari kontrakciós erő jelentős csökkenését (Belardinelli és mtsai, 1995; Gesztelyi és mtsai, 2003b).

A kamrán az  $A_1$  receptor aktivitása képes nyugalmi szintre vinni a kontrakciós erőt (indirekt negatív inotrópia), ami a fokozott adenilát-cikláz működés gátlásának köszönhető. Az  $A_1$  receptor aktiváció a pitvaron még a nyugalmi szintnél is kisebb kontrakciós erőhöz vezet (direkt negatív inotrópia), ami részben a befelé egyenirányító  $K^+$  csatornák fokozott supraventricularis jelenlétével magyarázható (Bohm és mtsai; 1985; Kurachi és mtsai, 1986; Belardinelli és mtsai, 1995).

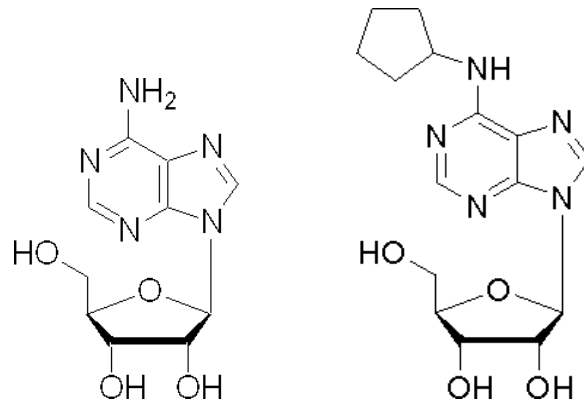


4. ábra. Az A<sub>1</sub> adenoszin receptor jelátviteli mechanizmusai (Deb és mtsai, 2019).  
A rövidítések magyarázatát lásd a szövegben.

### 2.3. Az alkalmazott A<sub>1</sub> adenoszin receptor ligandok

Az A<sub>1</sub> receptorok stimulálása a különböző szövetekben citoprotektív és regeneratív hatásokat eredményez, így az A<sub>1</sub> receptor agonisták terápiás céllal történő fejlesztése komoly lehetőségeket hordoz. Jelenleg három fő terápiás céllal vizsgálják őket, antiarrhythmias és antianginás szereként, antilipolitikus szerként, illetve antinociceptív hatóanyagként (Elzein és Zablocki, 2008; Schenone és mtsai, 2010; Szentmiklósi és mtsai, 2011a; Staehr és mtsai 2013).

Az endogén agonista adenoszin bomlékonysága nehezíti a pontos E/c görbék felvételét, ezért az A<sub>1</sub> receptorok vizsgálatára alkalmasabbak a stabilabb szintetikus A<sub>1</sub> receptor agonisták. Ezek a szerek jobban ellenállnak az adenoszin metabolizmusában szerepet játszó enzimeknek (Pavan és IJerman, 1998; Fredholm és mtsai, 2001, 2011a). A stabilabb agonisták közös tulajdonsága, hogy a velük felvett E/c görbék balra toltak az adenoszin E/c görbéhez képest (Gesztelyi és mtsai, 2003b). Ilyen szintetikus adenoszin analóg a CPA (N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine), vizsgálataink során a leggyakrabban ezt alkalmaztunk (5. ábra).

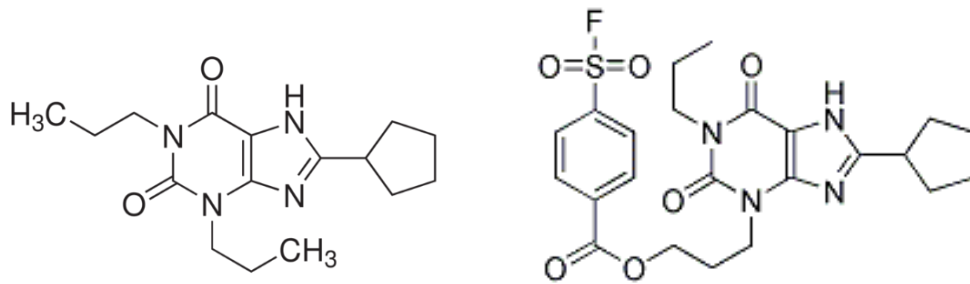


5. ábra. Az adenzin (balra) és a CPA (jobbra) konstitúciós képlete

A CPA szelektív  $A_1$  receptor teljes (full) agonista, ami az adenzinhez hasonlóan purinvázis molekula. A felezési ideje az adenzinénál jóval hosszabb, mintegy 6 perc patkány vérmintában mérve (Mathot és mtsai, 1993), vértelen pitvaron azonban még ennél is stabilabbnak mutatkozott (Gesztelyi és mtsai, 2004). A cardiovascularis terápiás céllal fejlesztett  $A_1$  receptor agonisták gyakran a CPA-ból indulnak ki (Elzein és Zablocki, 2008; Deb és mtsai, 2019).

Az  $A_1$  receptor antagonistákat gyakorlati szempontból két csoportba oszthatjuk: a xantin és a nem xantin származékok (Aljarari és mtsa, 2012). A legegyszerűbb, reverzibilis, nem szelektív, kompetitív antagonisták a metil-xantinok, melyeknek legismertebb természetes képviselői a koffein és a teofillin. Ezeket régóta alkalmazzák teljesítményfokozóként, illetve hörgőtágítóként. Terápiás céllal ma már ritkábban használatosak, mivel az  $A_1$  receptor gátlásával pozitív tróp hatásokat hoznak létre a szíven, ami sok esetben káros mellékhatásként jelentkezik. Kísérleti céllal való alkalmazásuk hátránya, hogy receptor antagonisták hatásuk mellett foszfodiészteráz gátlók és ryanodin receptor agonisták is (bár a szívbeli ryanodin receptor izoformára kevésbé hatnak) (Szentmiklósi és mtsai, 2011b).

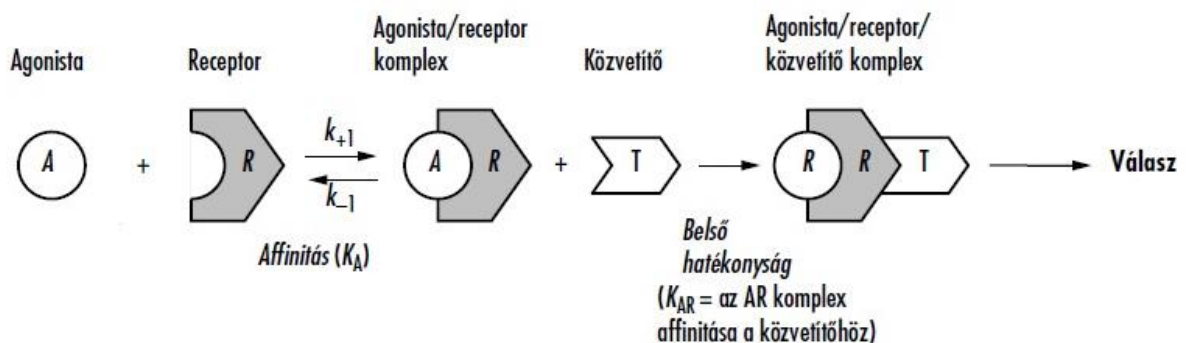
Az első szelektív  $A_1$  receptor antagonisták közé tartozik a reverzibilis hatású DPCPX (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine). Ebből fejlesztették ki az irreverzibilis  $A_1$  receptor antagonistát FSCPX-et (8-cyclopentyl-3-[3-[[4-(fluorosulfonyl)benzoyl]oxy]propyl]-1-propylxanthine) (6. ábra). Ez utóbbi először reverzibilisen kötődik a receptorhoz, de egy időigényes folyamat során kovalens kötést alakít ki (Srinivas és mtsai, 1996; Morey és mtsai, 1998; Fredholm és mtsai, 2001). Vizsgálataink során az FSCPX-et úgy alkalmaztuk, hogy megfelelő mennyiségű idő álljon rendelkezésre az FSCPX irreverzibilis kötődéséhez.



6. ábra. A DPCPX (balra) és FSCPX (jobbra) konstitúciós képlete

## 2.4. A receptor rezerv

Az agonista-receptor interakció első lépése az agonista kötődése a receptorhoz, amely a két molekula „illeszkedésének” komplementaritásától függ. Minél nagyobb a köztük lévő (általában nem kovalens) kötések száma, annál nagyobb lesz az agonista affinitása a receptorhoz (az affinitás az agonista-receptor komplex stabilitásának jellemző paramétere). Míg az agonistáknak és az antagonistáknak is van affinitásuk a receptorhoz, addig csak az agonistának van olyan sajátos tulajdonsága, hogy a sejt működését befolyásoló hatásokat generáljon (intrinzik hatékonyság). Legegyszerűbb esetben az agonista-receptor komplex kialakulása után, a receptor konformációjában bekövetkező változások már önmagukban választ váltanak ki (pl. ioncsatorna receptorok esetén), bonyolultabb esetben azonban a komplex a sejt valamelyik transzduktor eleméhez (pl. G-protein) kapcsolódik és általa indukálja a válaszhoz vezető folyamatokat (7. ábra).



7. ábra. Az agonista-receptor-transzduktor komplex kialakulása (Neal, 2012)

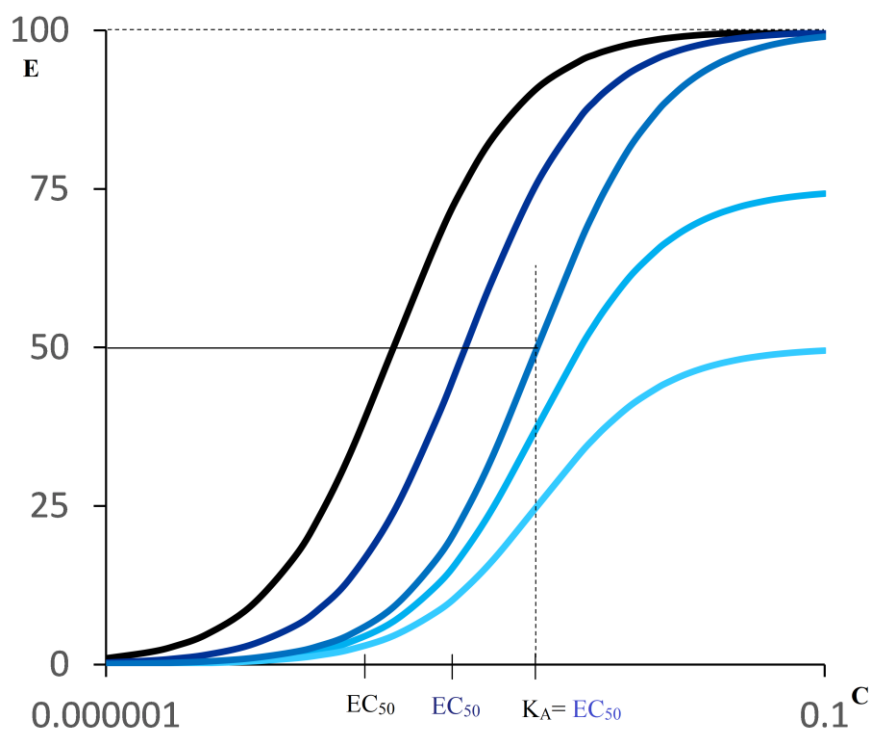
A receptor rezervet, melynek fogalmát először a hagyományos receptor elmélet vezette be (Ruffolo, 1982), úgy lehet megragadni, mint egy agonista és egy receptoriális

rendszer (receptor + jelátvitel) közötti, sejtválaszhoz vezető kölcsönhatás integratív jellemzőjét, ami a hatáskiváltó képesség egy bizonyos szempontból vett mértéke. Az intrinzik hatékonyságon túl integrálja a receptor és a receptort hordozó sejt idevágó tulajdonságait és a vizsgált hatás jellemzőit is (a hozzá vezető jelátviteli utak tulajdonságain keresztül). Noha a manapság elterjedt receptor modellek nem mindegyike használja ezt a fogalmat, a mögöttes jelenség, miszerint a receptorok szubmaximális frakciójának stimulációja kiválthatja a maximális hatást, széles körben ismert (Giraldo és mtsai, 2002; Dhalla és mtsai, 2003; Kenakin, 2018). A receptor rezerv meghatározása ezen a jelenségen alapszik, amelynek során a receptorok egy része visszafordíthatatlanul inaktíválódik oly módon, hogy a fennmaradó részük megőrizze funkcionális épségét. Minél nagyobb a receptor rezerv, annál nagyobb receptor hányadot kell inaktíválni a maximális válasz kimutatható csökkenésének elérése érdekében (Morey és mtsai, 1998; Kenakin, 2018). A receptor rezerv tehát a receptoriális rendszer „ellenállását” (vagy „tehetetlenségét”) fejezi ki egy olyan beavatkozás ellen, ami csökkenti a működőképes receptorok számát. A receptor rezervet tehát az agonista, a receptor, a szövet és a mért hatás határozza meg (Brown és Goldstein, 1986; Srinivas és mtsai, 1997; Fenouillet és mtsai, 2019).

A jelenség fiziológiai jelentősége az lehet, hogy a nagy receptor rezerv lehetővé teszi az endogén agonisták számára a receptor gyors aktiválását (Kenakin, 2018), vagy általánosságban az adott receptoriális rendszer gyors és erőteljes válaszát. A receptor rezervvel kapcsolatos információk nagyon hasznosak egy adott agonista viselkedésének előrejelzéséhez egy adott szövetben egy adott hatás mérése esetén. Ha egy szövetben (sejttípuson) a receptor rezerv kicsi, akkor csak a nagy hatékonyságú agonisták válhatnak ki komoly hatást (akár full agonistaként is), míg a kis hatékonyságú agonisták nem képesek kiváltani jelentős választ (parciális agonistaként viselkednek). Másfelől, ha nagy a receptor rezerv, akkor még a kis hatékonyságú agonisták is képesek lehetnek jelentős hatást kifejteni (néha full agonistaként is). Így kis hatékonyságú agonisták alkalmazásával biztosítható a szöveti szelektivitás abban az értelemben, hogy a hatásuk csak a nagy receptor rezervvel rendelkező szövetekben lesz erős. Ennek a jelenségnek a terápiás potenciálját ma már ki is használják (Dhalla és mtsai, 2003; Albrecht-Küpper és mtsai, 2012; Greene és mtsai, 2016; Seemann és mtsai, 2017; Peleli és mtsai, 2017).

A receptor rezervet – multifaktorális eredete miatt – érdemes megvizsgálni minden szóba jövő agonista, receptoriális rendszer (szövet) és hatás esetében (Dhalla és mtsai, 2003; Kenakin, 1997, 2018). A receptor rezerv legegyszerűbb mutatója a pharmacological shift ratio (PSR), ami megegyezik a félmáximális receptor okkupációhoz ( $K_A$ ) és a félmáximális

hatáshoz ( $EC_{50}$ ) szükséges agonista koncentráció hányadosával:  $PSR = K_A / EC_{50}$ . Ez alapján receptor rezervről akkor beszélhetünk, ha a félmaksimalis hatáshoz nem szükséges a receptorok felének elfoglalása ( $PSR > 1$ ). A PSR tehát a receptor rezervet egyetlen értékkel jellemzi (Ruffolo, 1982; Morey és mtsai 1998) (8. ábra).



8. ábra. A PSR értelmezése E/c görbék segítségével. Az adott agonistával felvett az E/c görbe esetén a rendszerhez irreverzibilis antagonistát növekvő koncentrációban adva (világosodó görbék) az agonista mindaddig kiváltja a maximális hatását, míg az  $EC_{50}$  el nem éri a  $K_A$  értéket, ami után már a maximális hatás ( $E_{max}$ ) nem érhető el többé.

Kifinomultabb mutató a receptor rezerv százalékos aránya (RR%), amely a százalékos hatás (E%) és a százalékos receptor okkupancia különbsége ( $\rho\%$ ) (mindkét utóbbi érték a maximumaik százalékában kifejezve):  $RR\% = E\% - \rho\%$  (Kenakin, 1997). Az RR% a receptor rezerv lényegét mutatja meg, vagyis azt, hogy a teljes receptor populáció egy adott százalékának stimulálása a maximális hatás ennél nagyobb százalékát váltja ki, tehát a receptorok egy része „tartalék” (Kenakin, 2018). Mint látható, az RR% az E% konkrét értékétől függ, az E% az RR% aszimptotikus maximuma. Az RR%-ot rendszerint önkényesen megválasztott E% értékekre számítják ki, például a maximális felére vagy a (közel) maximális hatásra. Ehhez először a  $K_A$  értéket kell meghatározni.

Receptor rezerv csak full agonista esetén határozható meg. Ennek leggyakoribb

módja, hogy az agonistával az irreverzibilis antagonisták hiányában és jelenlétében is felvesznek E/c görbéket, melyeket azután többféleképpen is lehet elemezni (Motulsky és Christopoulos, 2004).

## 2.5. Az A<sub>1</sub> adenosin receptor rezerv

Az adenosin receptorok általános előfordulása, valamint az ortosztérikus kötőhely sejtfelszíni elhelyezkedése miatt az extracelluláris adenosin koncentráció központi szerepet játszik a szervezetben. Az adenosin extracellulárisan felhalmozódik metabolikus stressz (ATP depléciónak) és sejtkárosodás hatására. Ezzel összhangban az adenosin receptorok elsősorban a védő és regeneráló hatásokat közvetítik, és alapvető szerepet játszanak számos kóros állapot és betegség lefolyásának modulálásában (Peleti és mtsai, 2017; Fredholm és mtsai, 2001, 2011b). Az A<sub>1</sub> adenosinerg rendszer vizsgálata tehát potenciális terápiás kitörési pontokat hordoz magában, azonban a szisztémásan beadott adenosin receptor agonisták kockázatot is jelentenek, hiszen szinte bármelyik szöveten választ indukálhatnak (Dhalla és mtsai, 2003).

A különböző szövetek válaszadó képességét legfőképp két (egymástól nem független) paraméter határozza meg, a receptor denzitás és a receptor rezerv. Az A<sub>1</sub> receptorok koncentrációjának és receptor rezervjének szöveti eloszlása jól (és pozitívan) korrelál egymással. A receptor rezerv korábban ismert tulajdonságainak köszönhetően egy helyesen megválasztott agonista képes valamelyest szövetspecifikusan hatni. A zsír- és az idegszövethez képest például a myocardium kis A<sub>1</sub> receptor rezervvel rendelkezik az elektrofiziológiai hatások tekintetében, ezért a zsírszövetet és az idegrendszert megcélzó gyógyszerek általában kis kardiális kockázattal járnak (Dhalla és mtsai, 2003).

A receptor rezerv hatásfüggése (Brown és Goldstein, 1986; Srinivas és mtsai, 1997) miatt az A<sub>1</sub> receptor rezervet minden terápiásan jelentős hatásra meg kell vizsgálni. Munkacsoportunknak korábban sikerült meghatározni az A<sub>1</sub> adenosinerg rendszer receptor rezervjét a pitvari direkt negatív inotrópiára nézve néhány ismertebb stabil full agonistával (Gesztelyi és mtsai, 2013), majd a bomlékony adenosinnal is (Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014).

## 2.7. Az alkalmazott kvantitatív modellek

### 2.7.1. A Hill egyenlet

A Hill egyenlet, mint a legrégebbi kvantitatív receptorműködési modell, számos receptorelmélet alapjául szolgál. A Hill egyenletet a mai napig gyakran alkalmazzák ligandkötési vagy E/c eredmények feldolgozására. A Hill modell a görbéket jellemzően három paraméter segítségével írja le, módosított formái ugyanakkor két (elhagyva a meredekségi tényezőt) vagy négy paraméteresek (bevezetve a 0-tól különböző alapot) is lehetnek (Giraldo és mtsai, 2002; Motulsky és Christopoulos, 2004; Prinz, 2010; Gesztelyi és mtsai, 2012; Finlay és mtsai, 2020).

A receptorok, mint a sejtfelszínen vagy sejten belül elhelyezkedő makromolekuláris struktúrák, képesek bizonyos ligandok specifikus megkötése révén jelfelismerésre (kognitív funkció), illetve ezt követően változás létrehozására a sejt működésében (transzducer funkció). Ebben részt vehetnek a sejt egyéb makromolekuláris alkotói (enzimek, csatornák, transzporterek), melyek nem feltétlenül kapcsolódnak közvetlenül a receptorhoz, de a hatás kiváltásában nélkülözhetetlen szerepük van (posztreceptorális szignalizáció). A hatás létrehozása során jelerősítés is történhet, amely nagyban függ a posztreceptorális szignalizáció összetettségétől (Kenakin, 2018).

A tág értelemben vett Hill egyenletnek két fő formáját szokás megkülönböztetni. A ligand-receptor komplex kialakulását kvantifikáló egyenletet – nemzetközi ajánlás szerint – Hill-Langmuir egyenletnek nevezik, míg az agonista (receptorközeli) koncentrációja és a kiváltott hatás közötti kapcsolatot leíró – formailag azonos – egyenletet Hill egyenletként említik (Neubig és mtsai, 2003).

A Hill-Langmuir egyenlet a ligand(ok) megkötését egy lépésben tételezi fel (1. egyenlet). A tömeghatás törvényéből kiindulva felírható a folyamatban részvevő anyagok koncentrációinak viszonya az egyensúlyi állapotban (2. egyenlet):



$$[L_nR] = [R_0] \cdot \frac{[L]^n}{[L]^n + K_d} = [R_0] \cdot \frac{[L]^n}{[L]^n + (K_A)^n} \quad \text{2. egyenlet}$$

Ahol:  $L$  – a ligand;  $R$  – a receptor;  $L_nR$  – a ligand-receptor komplex;  $[L_nR]$  – a ligand-receptor komplex koncentrációja;  $[R_0]$  – a összes (szabad és kötött) receptor koncentrációja;  $[L]$  – elviekben a szabad ligand koncentrációja, a gyakorlatban (egyszerűsítésként) a teljes (szabad és kötött) ligand koncentráció;  $k_1$  illetve  $k_2$  – a ligand-receptor komplex asszociációjának illetve disszociációjának sebességi állandója;  $K_d = k_2/k_1$  – a ligand-receptor komplex egyensúlyi disszociációs állandója;  $K_A$  – a féltelítési ligand koncentráció (ha  $n = 1$ , egyenlő a  $K_d$ -vel);  $n$  – az 1. egyenletben a ligand kötőhelyek száma egy receptoron, a 2. egyenlet gyakorlati alkalmazásakor azonban összetett értelmű paraméternek mutatkozott, ezért jobb egyszerűen csak Hill koefficiensnek (vagy meredekségi tényezőnek) nevezni (Gesztelyi és mtsai, 2012; Kenakin, 2018; Finlay és mtsai, 2020).

A 2. egyenletben található  $K_A$  állandó (nem összekeverendő a félmaximális receptor okkupancia jelölésével, amit szintén jelölnek  $K_A$ -val) a ligandkötés erősségének (vagyis az adott ligand receptorhoz való affinitásának) a jellemzője. A  $K_A$  értéke fordítottan arányos az affinitás erősségével. Antagonista ligand esetében a  $K_A$  helyett inkább a  $K_B$  jelölést használják (Kenakin, 2018).

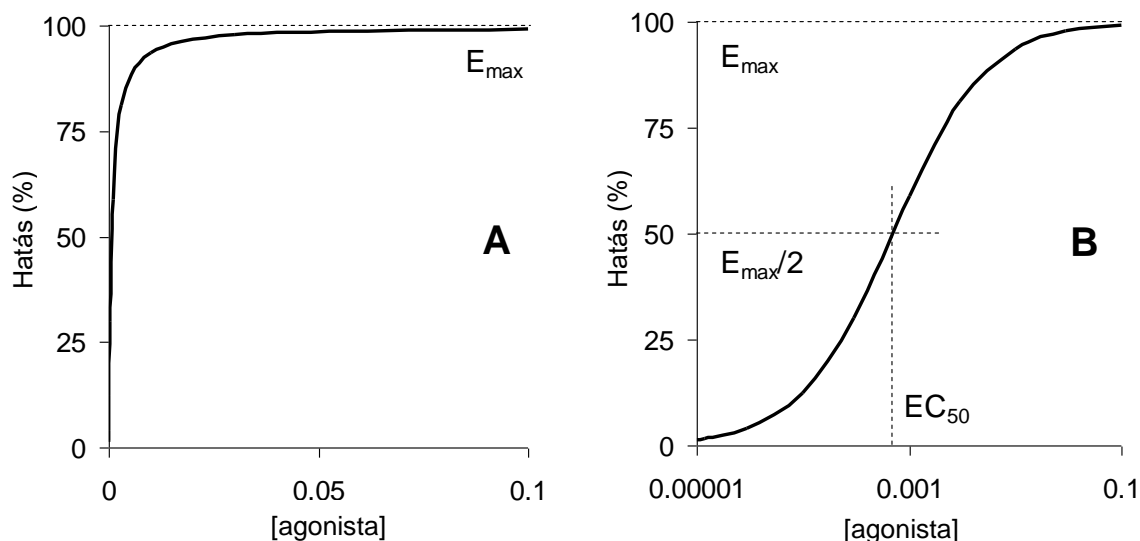
A (hivatalos ajánlás szerinti, tehát szűk értelemben vett) Hill egyenletet (3. egyenlet), mint az első kvantitatív receptor modellt, mind a mai napig széleskörben alkalmazzák E/c görbék regresszióanalízisére:

$$E = E_{\max} \cdot \frac{c^n}{c^n + EC_{50}^n} \quad 3. \text{ egyenlet}$$

Ahol:  $c$  – az agonista koncentrációja;  $E$  – a kiváltott hatás;  $E_{\max}$  – az adott rendszerben az adott agonistával elérhető maximális hatás;  $EC_{50}$  – a maximális hatás feléhez tartozó agonista koncentráció;  $n$  – a Hill koefficiens (Hill slope faktor, meredekségi tényező) (Gesztelyi és mtsai, 2012; Kenakin, 2018).

A Hill egyenletet érdemes úgy illeszteni, hogy az x tengelyen a koncentráció logaritmusát tüntetjük fel. Ennek több előnye is van. A koncentráció jellegű mennyiségek (pl.  $EC_{50}$ ) adathalmaza rendszerint nem normális eloszlású, viszont a logaritmusuk általában az (ami megkönnyíti ezek statisztikai elemzését). Emellett a szemilogaritmikus ábrázolású E/c görbék szemléletesebbek, mivel a logaritmus a kis koncentrációk tartományát megnyújtja, a nagy koncentrációkét pedig összezsugorítja, így az  $EC_{50}$  (pontosabban  $\log EC_{50}$ ) értékét a görbe szimmetriaközpontjává teszi.

A Hill egyenlet által meghatározott függvény lineáris X és Y tengely mellett ábrázolva ( $n=1$  esetén) hiperbola alakot vesz fel, míg szemilogaritmikus ábrázolás esetén (logaritmikus X és lineáris Y tengely) szigmoid lefutású. A függvény középpontjában a  $\log EC_{50}$  áll, ami egyben a görbe inflexiós pontja is (9. ábra) (Gesztelyi és mtsai, 2012).

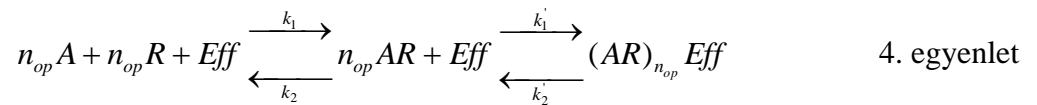


9. ábra: A Hill egyenlet lineáris (A) és szemilogaritmikus (B) ábrázolása. A paramétereket úgy választottuk meg, hogy egy full agonista tipikus E/c görbét reprezentálják ( $E_{max}=100\%$ ;  $EC_{50}=700 \mu M$ ;  $n=1$ ). Az X tengelyen az agonista moláris koncentrációját vettük fel lineáris (A) illetve logaritmikus lépték mellett (B), az Y tengelyen pedig az agonista által kiváltott hatást ábrázoltuk a maximális hatás ( $E_{max}$ ) százalékában lineáris léptékben. A görbék szimmetrikusak, vagyis logaritmikus X tengely mentén ábrázolva a függvény középpontja ( $EC_{50}$ ;  $E_{max}/2$ ) egyben az inflexiós pont is.

A Hill egyenlet segítségével végrehajtott regresszióanalízis kétváltozós ( $c$ ,  $E$ ), háromparaméteres ( $E_{max}$ ,  $EC_{50}$ ,  $n$ ) és nem lineáris (mivel nem az  $y = a \cdot x + b$  képletet követi). A Hill egyenlet a görbeillesztés szempontjából rugalmas, hiszen jelentős mérési hibával terhelt, vagy nagy biológiai variabilitást mutató  $E$  adatok esetén is általában jó becslés kapható vele (Giraldo és mtsai, 2002). A Hill egyenlet feltételezi az E/c görbék szimmetriáját, ami esetek többségében (jó közelítéssel) teljesül is. Ennek köszönhetően általánosan használható, viszont paraméterei ( $E_{max}$ ,  $EC_{50}$ ,  $n$ ) empirikusak, vagyis nem fiziko-kémiai állandók (Giraldo és mtsai, 2002).

### 2.7.2. Az agonizmus operatív modellje

Az operatív modell, csakúgy, mind a Hill egyenlet, olyan kvantitatív receptorműködési modell, amely nem tartalmaz konkrét megkötéseket a receptor működési mechanizmusára vonatkozóan. Az agonizmus operatív modellje az agonisták receptorhoz történő affinitásának és hatásgeneráló képességének kvantifikálására szolgál (Black és Leff, 1983; Giraldo és mtsai, 2002; Jakubík és mtsai, 2020). Ebből következik, hogy a modell a receptorfunkciót két részletben tárgyalja, a kétlépcsős reakcióegyenlet külön foglalkozik a receptor jelfelismerő illetve a transzducer funkciójával (Black és Leff, 1983; Kenakin, 2018):



Ahol (a korábban nem definiált jelölések):  $A$  – az agonista;  $Eff$  – az effektor (a hatás létrehozásában szerepet játszó posztreceptorális útvonal elemei összefoglalóan), amely affinitással rendelkezik az agonista-receptor komplex irányában;  $AR$  – az agonista-receptor komplex;  $(AR)_{n_{op}}Eff$  – az agonista-receptor-effektor komplex;  $k_1'$  illetve  $k_2'$  – az agonista-receptor-effektor komplex asszociációjának illetve disszociációjának sebességi állandója;  $n_{op}$  – eredetileg az agonista-receptor-effektor komplexben az egy effektorhoz kapcsolódó agonista-receptor komplexek száma.

A 4. egyenletben szereplő anyagok egyensúlyi koncentrációi kifejezhetőek egyrészt a Hill-Langmuir egyenlettel, másrészt egy a Hill egyenlettel alakilag azonos összefüggéssel (Black és Leff, 1983):

$$[AR] = [R_0] \cdot \frac{[A]}{[A] + K_A} \quad 5. \text{ egyenlet}$$

$$[(AR)_{n_{op}}Eff] \sim E = E_{\max} \cdot \frac{[AR]^{n_{op}}}{[AR]^{n_{op}} + K_E^{n_{op}}} \quad 6. \text{ egyenlet}$$

Ahol (a korábban be nem vezetett jelölések):  $[A]$  – az agonista koncentrációja;  $[AR]$  – az agonista-receptor komplex koncentrációja;  $K_A$  – az agonista-receptor komplex egyensúlyi disszociációs állandója, ami megadja a féltelítési agonista koncentrációt;  $[(AR)_{n_{op}}Eff]$  – az agonista-receptor-effektor komplex koncentrációja, amiről a modell feltételezi, hogy egyenesen arányos a hatás

nagyságával;  $E_m$  – az adott rendszerben az adott agonistával elérhető maximális hatás;  $K_E$  – a félmaximális hatást ( $E_{max}/2$ ) létrehozó agonista-receptor komplex koncentráció. A 6. egyenletben szereplő  $n_{op}$  (operatív slope faktor) megfeleltethető a Hill egyenlet Hill koefficiensének. Utóbbihoz hasonlóan az operatív slope faktor is sokkal inkább a jelátviteli mechanizmusok összességét jellemzi, mintsem a szignáltranszdukció molekularitását.

Az 5. egyenletből kifejezett  $[AR]$ -t beírva a 6. egyenletbe, bevezetve az operatív hatékonyságot ( $\tau = [R_0]/K_E$ ), mint az agonista hatáslétrehozó képességét (efficacy) jellemző paramétert, továbbá egyszerűsítve az agonista koncentráció jelölését ( $[A] = c$ ):

$$E = E_{max} \cdot \frac{(c \cdot \tau)^{n_{op}}}{(c \cdot \tau)^{n_{op}} + (c + K_A)^{n_{op}}} \quad 7. \text{ egyenlet}$$

Az operatív modell így kapott egyenlete közvetlenül illeszthető a modell feltételeinek megfelelő  $E/c$  görbékre (ld. lentebb), ezáltal meghatározhatóvá válik a  $K_A$ ,  $E_{max}$  és  $\tau$  (valamint a kis gyakorlati jelentőségű  $n_{op}$ ) értéke (Black és Leff, 1983; Kenakin, 2018; Gesztelyi és mtsai, 2013). Míg a  $K_A$  fiziko-kémiai konstans, addig a többi empirikus állandó (Giraldo és mtsai, 2002).

Az agonizmus operatív modellje tehát kétváltozós ( $c$ ,  $E$ ), négyparaméteres ( $E_{max}$ ,  $K_A$ ,  $\tau$ ,  $n_{op}$ ), nem lineáris regresszióanalízis, amelyet az eredmény pontossága érdekében globálisan kell illeszteni egy natív és egy irreverzibilis antagonistával való kezelés után felvett  $E/c$  görbére (melyek esetében csak az antagonistá-kezelés megléte vagy hiánya lehet különbség). Az irreverzibilis antagonistát – amennyiben lehetséges – olyan koncentrációban kell alkalmazni, hogy számottevően csökkentse az  $E/c$  görbe maximumát a natív  $E/c$  görbéhez képest. Az antagonistát alkalmazás után el kell távolítani a rendszerből az  $E/c$  görbe felvétele előtt, hogy szabad formában ne legyen jelen. A natív és az antagonistával kezelt  $E/c$  görbék tehát a funkcióképes receptorok koncentrációjában különböznek egymástól. Mivel illesztéskor az  $E_{max}$ ,  $K_A$  és  $n_{op}$  paraméterek megosztásra kerülnek (tehát azonosak lesznek a natív és a kezelt  $E/c$  görbék esetén), az illesztett egyenlet a görbék közti különbséget a  $\tau$  paraméter változásával veszi figyelembe (Motulsky és Christopoulos, 2004).

Az agonizmus operatív modelljének elméleti alapon bírált sajátossága, hogy reakcióegyenlete (4. egyenlet) nem kezeli külön lépésként az agonista-receptor komplex kialakulását és a receptor aktív konformációba történő átrendeződését (Colquhoun, 1998, 2006; Bindslev, 2008). Ez hozzájárulhat ahhoz, hogy a kísérleti adatokra illesztett 7. egyenlet

sok esetekben pontatlanul adja meg a  $K_A$  értékeket (a meghatározott  $K_A$  értéket ugyanis az agonista efficacy-je is befolyásolja). A 7. egyenlettel meghatározott  $K_A$  értékekkel ezen okból kifolyólag óvatosan kell bánni (Colquhoun, 1998, 2006). Az operatív modell másik problémája, hogy matematikailag nem vezethető vissza az elfogadott, egyszerűbb kvantitatív receptorfunkciós modellek egyikére sem (pl. a Hill modellre), vagyis nem teljesen kompatibilis velük (Buchwald, 2017, 2019).

### 2.7.3. *A receptoriális válaszkészség módszer (RRM)*

A receptoriális válaszkészség módszer (receptorial responsiveness method: RRM) egy adott agonista receptorközeli koncentrációjának akut növekedését kvantifikáló metódus. A vizsgálni kívánt rendszertől függően akár közvetlenül is meghatározható a kérdéses többlet koncentrációja. Bonyolultabb, több agonistát tartalmazó rendszereknél a meghatározni kívánt agonista többlet koncentrációját a módszer egy másik agonista ekvielektív koncentrációjával helyettesíti (Gesztelyi és mtsai, 2004).

Ahhoz, hogy megértsük az RRM működését, az alábbi jelenséget kell átgondolnunk. Ha egy biológiai rendszerben egy olyan agonistát alkalmazunk, amelyik szelektíven izgatja a rendszer egyik receptorát, az agonista adott dózisának ismételt beadása esetén, ha az első dózis által létrehozott állapotot vesszük kiindulási állapotnak, kisebb választ kapunk, mint az első dózis által kiváltott válasz önmagában. Ennek a jelenségnek a magyarázata, hogy az első dózis során az adott agonista a receptorok egy részéhez kapcsolódva és a hatást kiváltva elhasználja a rendszer válaszadó kapacitásának egy részét. Ennek következtében a második dózis során bevitt agonista molekulák számára már kevesebb szabad receptor (és a jelátvitelben részt vevő molekula) áll rendelkezésre. Ha az adott dózis akkora, hogy a kiváltott hatás közelíti a kiváltható maximális hatást, a második dózis beadását követően akár teljes válaszképtelenséget is tapasztalhatunk. Ez a jelenség természetesen nem receptoriális deszenzitizáció, hanem az első dózis figyelmen kívül hagyásának következménye.

Ez a jelenség abban az esetben is megfigyelhető, ha az adott rendszerben két különböző agonista van, melyek ugyanazt a jelátviteli útvonalat használják. Lehetnek ugyanazon receptor agonistái is, de már az is elegendő, ha csak ugyanazt a szignalizációs utat befolyásolva ugyanazt a választ váltják ki (Gesztelyi és mtsai, 2004; Greczer és mtsai, 2010a, 2010b).

Vegyünk egy biológiai rendszert, mely tartalmazza két különböző agonista közös receptorát. A rendszerbe elsőként bejutó agonistát nevezzük torzító agonistának, míg a rendszerbe másodjára kerülő agonista legyen a teszt agonista. Az a hatás, melyet a teszt agonista hoz létre a torzító agonista figyelembe nem vett jelenléte mellett, a torzult hatás, míg a teszt agonista azon hatása, melyet a torzító agonista hatásának figyelembevételével kaphatunk, a torzítatlan hatás. Ekkor a torzult és a torzítatlan hatások kapcsolatát az alábbi egyenlet szemlélteti (Gesztelyi és mtsai, 2004; Greczer és mtsai, 2010a):

$$E' = 100 - \frac{100 \cdot (100 - E)}{100 - E_{bias}} \quad \text{8. egyenlet}$$

Ahol:  $E'$  – a torzult hatás (a teszt agonistának tulajdonítjuk, de mivel a teszt agonista és a torzító agonista közös hatása, inkorrekt);  $E$  – a torzítatlan hatás (a teszt agonista és a torzító agonista korrekt módon meghatározott közös hatása);  $E_{bias}$  – a torzító agonista (biasing agonist) koncentráció korrekt módon meghatározott hatása (melynek figyelmen kívül hagyása okozza az  $E'$  torzult voltát).

Ha egy rendszerben valamilyen okból kifolyólag megnő egy olyan agonista koncentrációja, ami egy, a rendszerben található receptorhoz kapcsolódik, akkor a 8. egyenlettel bizonyos (később részletezett) feltételek teljesülése mellett meghatározható az adott agonista (mint torzító agonista) többlet koncentrációja. A meghatározáshoz két E/c görbe felvételére van szükség, az egyiket a többlet agonista koncentráció hiányában (torzítatlan E/c görbe), míg a másikat annak jelenlétében (torzult E/c görbe) kell felvenni. (A megbízhatóságot növeli, ha nem egy-egy E/c görbét veszünk fel, hanem mindkettőből többet, melyeket átlagolunk. Az E/c görbe átlagolásnak – az RRM kivitelezéséhez használt szoftvertől függően – legalább két módja van.)

A torzító agonista koncentrációjának regresszióanalízissel való meghatározásához meg kell választani azt a receptorműködési modellt, ami kellően egyszerűen és pontosan tudja definiálni a hatás és az azt kiváltó agonista koncentráció közötti kapcsolatot. A legáltalánosabb ilyen modell a Hill egyenlet, amely a hatás és a koncentráció közötti kapcsolatot három empirikus paraméterrel ( $E_{max}$ ,  $EC_{50}$ ,  $n$ ) jellemzi (Gesztelyi és mtsai, 2012; Finlay és mtsai, 2020).

Az RRM kiindulási egyenlete (8. egyenlet) és a Hill egyenlet (3. egyenlet) kombinálásával (9. egyenlet, ld. később) a torzult hatás kifejezhető a torzító többlet agonista

koncentráció, a teszt agonista koncentráció és a torzítatlan E/c kapcsolatot leíró három Hill paraméter segítségével (Gesztelyi és mtsai, 2004; Greczer és mtsai, 2010a). A torzult hatás értékeket a torzult E/c görbe adja, míg a Hill paraméterek a torzítatlan E/c görbe regresszióanalízise révén kaphatók meg. A két E/c görbe felvételekor a rendszer minden tulajdonsága azonos kell legyen, kivéve természetesen a torzító agonista jelenlétét. Az RRM és a Hill egyenlet kombinált egyenlete így egyetlen variábilis paramétert tartalmaz, a torzító agonista koncentrációját. Ezt úgy kapjuk meg, hogy a torzult E/c görbékre illesztjük a kombinált egyenletet úgy, hogy fix paraméterekként a torzítatlan E/c görbe Hill paramétereit használjuk (Gesztelyi és mtsai, 2004; Greczer és mtsai, 2010a).

A torzító agonista koncentrációját ( $c_{\text{bias}}$ ) célszerű megkülönböztetni az RRM kombinált egyenletének (9. egyenlet) variábilis paraméterétől ( $c_x$ ), noha utóbbi előbbi becslésére szolgál. A  $c_{\text{bias}}$  ugyanis nem szükségszerűen ugyanannak az agonistának a koncentrációja, mint a  $c_x$  (ami az E/c görbe felvételéhez használt agonistához tartozik), így számértékeik sem feltétlenül egyeznek meg. Az RRM kombinált egyenlete:

$$E' = 100 - \frac{100 \cdot \left( 100 - E_{\max} \cdot \frac{(c_x + c_{\text{test}})^n}{(c_x + c_{\text{test}})^n + EC_{50}^n} \right)}{100 - E_{\max} \cdot \frac{c_x^n}{c_x^n + EC_{50}^n}} \quad \text{9. egyenlet}$$

Ahol:  $E'$  – a torzult hatás (ahol a  $c_{\text{bias}} \neq 0$  van jelen, de ezt és az általa kiváltott hatást ( $E_{\text{bias}}$ ) figyelmen kívül hagyjuk);  $c_{\text{test}}$  – a teszt agonista koncentráció (az E/c görbe felvétele során beadott agonista koncentrációja);  $E_{\max}$ ,  $EC_{50}$  és  $n$  – a torzítatlan E/c görbének a Hill egyenlet illesztése által kapott paraméterei (a torzítatlan E/c kapcsolat leírói);  $c_x$  – a teszt agonista azon koncentrációja, amely ekvifektív a  $c_{\text{bias}}$ -szel (vagyis, ha az E/c görbe felvétele és az illesztés pontos,  $E_x = E_{\text{bias}}$ ).

Illesztéskor a 9. egyenletben a koncentrációt leíró mennyiségeket logaritmikus formában szerepeltetjük (pl.  $EC_{50}$  helyett  $10^{\log EC_{50}}$ ), mivel így az illesztés megbízhatóbb, továbbá a koncentrációt kifejező paraméterekre pontosabb konfidencia intervallum kapható (Motulsky és Christopoulos, 2004; Prism 7 Curve Fitting Guide, 2018).

Ahogy az már korábban említésre került, az RRM alkalmazásának nem feltétele a teszt és a torzító agonista egyezése, mindössze az általuk kiváltott (és általunk detektált) hatásnak kell azonosnak lennie. Ha a teszt és a torzító agonista megegyezik egymással, az

RRM variábilis paramétere megegyezik a torzító agonista koncentrációjával, vagyis pontos mérés és görbeillesztés esetén:  $c_x = c_{bias}$ . Ha a teszt és a torzító agonista különböznek, az RRM a teszt agonistának azon koncentrációját adja meg, ami akkora hatást vált ki az adott rendszerben, mint a torzító agonista koncentrációjának növekménye (vagyis  $c_x \neq c_{bias}$ , de  $E_x = E_{bias}$ ) (Gesztelyi és mtsai, 2004; Greczer és mtsai, 2010a). Az RRM fontos tulajdonsága, hogy egy nehezen hozzáférhető helyről, a receptorok közvetlen környezetéről ad információt. Az RRM másik előnye, hogy két különböző, de azonos hatás kiváltására képes agonista közül a stabilabb segítségével tudjuk jellemezni a kevésbé stabil koncentrációváltozását (melyet esetleg közvetlenül nem is tudnánk meghatározni) (Gesztelyi és mtsai, 2004; Karsai és mtsai, 2006, 2007).

Habár az RRM egyenletét csak egy E/c görbére kell illeszteni, még egy E/c görbe (egy torzítatlan, azaz natív) szükséges a módszer kivitelezéséhez. Több kritériumnak is teljesülnie kell annak érdekében, hogy a módszer pontos és meghízható becslést adjon (Gesztelyi és mtsai, 2004; Greczer és mtsai, 2010a, 2010b):

1. Az agonisták által kiváltott biológiai válasz legyen jól mérhető.
2. A teszt agonista legyen kis bomlékonyságú és jó szöveti penetrációjú (hogy a teszt agonista koncentrációja gyakorlatilag azonos legyen az egész rendszerben).
3. A  $c_{bias}$  értéke legyen állandó a torzult E/c görbe felvétele alatt.
4. Szemilogaritmikus ábrázolás mellett a torzítatlan E/c görbén az  $E_{bias}$  értéke essen az alsó és felső görbület közötti, hozzávetőleg lineáris szakaszra.
5. A két E/c görbe felvétele alatt a receptorok száma és érzékenysége ne változzon.
6. Ha a teszt és a torzító agonista nem azonos,  $E_{max}$  értékük legyen hasonló.

#### 2.7.4. Az RRM szerepe az adenzinra vonatkozó receptor rezerv meghatározásában

Az adenzinra vonatkozó receptor rezerv meghatározásához NBTI-t használtunk, mivel növelte az egyébként gyorsan metabolizálódó adenzin féléletidejét az ENT1 típusú nukleozid transzporter gátlása révén (Karsai és mtsai, 2006, 2007). Emiatt azonban számolni kellett az NBTI létrehozta interstitialis adenzin koncentráció-többlet ( $c_{bias}$ ) torzító hatásával ( $E_{bias}$ ) (Gesztelyi és mtsai, 2004; Karsai és mtsai, 2006; Greczer és mtsai, 2010a). Az NBTI mellett felvett E/c görbéket tehát torzultnak tekintettük, a torzulást okozó adenzin többletet pedig az azonos hatást kiváltani képes CPA koncentrációval jellemeztük az RRM

segítségével. Mivel az NBTI által felhalmozott endogén adenzin CPA egyenértékének ismeretében megszerkeszthető az NBTI jelenlétében felvett adenzin E/c görbék torzítatlan formája, az FSCPX-előkezelés mellett és anélkül felvett adenzin E/c görbék összehasonlíthatóak lettek és a receptor rezerv – kvalitatíve – megítélhetővé vált (Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014).

## 3. Anyagok és módszerek

### 3.1. *In silico* módszerek

#### 3.1.1. A szimulálandó biológiai modell tulajdonságai

Fiziológiás körülmények között a myocardialis adenzin anyagcserét nettó interstitialis képződés és nettó intracelluláris elimináció jellemzi. Az adenzin homeosztázis extra- és intracelluláris folyamatait többféle transzmembrán nukleozid transzporter köti össze, ami dinamikus egyensúlyt eredményez az interstitialis adenzin szint szempontjából (Deussen és mtsai, 1999). Tengerimalac pitvar modellünkben a legfontosabb adenzin transzporter az ENT1, az interstitialis térben képződött adenzin zömmel a nagy kapacitású ENT1 segítségével lép be a sejtekbe (Dekanski és mtsai, 2004; Deussen és mtsai, 2006). Az interstitialis adenzin szint meghatározását a működő myocardiumban jelentősen megnehezíti az adenzin homeosztázis érzékenysége a külső hatásokkal szemben (Karsai és mtsai, 2006; Ramakers és mtsai, 2008). Ezzel szemben az adenzint bontó enzimekkel szemben viszonylag rezisztens adenzin analóg, a CPA interstitialis szintje pitvari preparátumban pontosan meghatározható és – megfelelő *ex vivo* körülmények között – könnyen számolható is (Gesztelyi és mtsai, 2004).

Izolált, ingerelt tengerimalac pitvarban az NBTI által okozott ENT1 blokádnöveli az endogén adenzin interstitialis szintjét azáltal, hogy minimalizálja az adenzin influxot a cardiomyocytákba, ezáltal pedig számottevően csökkenti az adenzin elimináció mennyiségileg legjelentősebb részét, az intracelluláris adenzin metabolizmust (Karsai és mtsai, 2006, 2007). Ennek megfelelően az NBTI két, egymással ellentétes folyamat beindításával módosítja az adenzin E/c görbét.

1. Az NBTI növeli az adenzinnal szembeni maximális választ ( $E_{max}$ ) és csökkenti a félmaximális válaszhoz szükséges adenzin koncentrációt ( $EC_{50}$ ), mivel mérsékli az exogén adenzin eliminációját.

2. Az NBTI csökkenti az  $A_1$  receptor agonistákkal elérhető  $E_{max}$ -ot és növelni az  $EC_{50}$ -et, mivel interstitialisan felhalmozza az endogén adenzint, amivel részben elhasználja (és ezáltal csökkenti) az  $A_1$  receptoroknak azt a válaszkészségét, amellyel egy ezt követően kivitelezett E/c görbe felvétele során rendelkeznének.

E két hatás eredőjeként az NBTI valamelyest deprimálja az adenzin E/c görbe  $E_{max}$ -át és látványosan csökkenti az  $EC_{50}$  értékét, legalábbis a tengerimalac pitvari  $A_1$  receptor által közvetített direkt negatív inotrópiát mérve hatásként (Karsai és mtsai, 2006, 2007). Ezzel szemben az NBTI hatása a CPA E/c görbéjére (ugyanabban a modellben) kevésbé összetett: csökkenti az  $E_{max}$ -ot és növeli az  $EC_{50}$ -et. Ez a jelenség teljes mértékben megmagyarázható az ENT1 gátlás következtében létrejött interstitialis adenzin felhalmozódással: az  $A_1$  receptorok válaszkészsége még a CPA E/c görbe felvétele előtt részben elhasználódott, ezért a CPA E/c görbén kisebbnek tűnt (Karsai és mtsai, 2006, 2007).

Összegezve: függetlenül az E/c görbe kivitelezéséhez használt  $A_1$  receptor agonista mibenlététől, az NBTI által interstitialisan létrehozott endogén adenzin többlet jellegzetesen torzítja az E/c görbét, jelesül deprimálja a hatás értékeket (köztük az  $E_{max}$ -ot is) és jobbra tolja a görbét (növeli az  $EC_{50}$ -et). Amennyiben az NBTI jelenlétében kialakult E/c görbe torzulás kizárólag az NBTI ezen hatásának következtében jön létre (vagyis az NBTI az E/c görbe felvételéhez használt agonista szintjét nem befolyásolja), a torzulás mértéke alkalmas az endogén adenzin interstitialis többletének kvantifikálására. Az RRM mint koncentrációbecslő eljárás a 9. egyenlet torzult E/c görbékre való illesztésén alapul, amelynek regressziós paramétere az E/c görbe felvételéhez használt agonistának a torzulást okozó agonista többlettel ekvifektív koncentrációját adja meg (Karsai és mtsai, 2006, 2007; Gesztelyi és mtsai, 2004).

Az RRM nagy előnye, hogy lehetővé teszi rövid felezési idejű agonisták akut felhalmozódott extra mennyiségének számszerű jellemzését. Az RRM hátránya ugyanakkor, hogy nem adja meg konkrétan a bomlékony agonisták akut koncentráció többletét, ehelyett egy ugyanahhoz a receptorhoz kapcsolódó (vagy legalábbis ugyanazon a jelátviteli útvonalon keresztül ható) stabil agonista ekvifektív koncentrációját szolgáltatja (Gesztelyi és mtsai, 2004).

Az előbbiekből szemponjtából az E/c görbéknek három típusát különböztethetjük meg: torzítatlan, torzult és korrigált. Az E/c görbe torzítatlan, ha minden agonistát figyelembe veszünk (a megfelelő koncentrációban). Az E/c görbe torzult, ha a hatás meghatározása során valamely agonista valamely koncentrációját nem vesszük figyelembe. A torzult E/c görbe korrekciójának célja a neki megfelelő torzítatlan E/c görbe reprodukálása. A korrekció során sokszor már az is eredmény, ha legalább a hatás értékek torzítatlanok lesznek.

Ha a figyelmen kívül hagyott extra agonista koncentráció ismert, vagy meghatározható (pl. az RRM-mel), a torzult E/c görbét tökéletesen korrigálni tudjuk egy az

RRM-hez köthető egyenlettel (8. egyenlet). Az RRM azonban lehetővé teszi a torzult E/c görbe – igaz, részleges – korrekcióját akkor is, ha nem tudjuk a torzító agonista koncentrációját, csak egy azzal ekvieffektív másik agonista koncentrációt, amit az RRM-mel kaptunk (Kiss és mtsai; 2013). *In silico* munkánk során a stratégiánk az volt, hogy egy szimulált bomlékony agonista torzult E/c görbét úgy korrigáljuk, mint ahogy arra a valódi torzult E/c görbék esetében lehetőség van. Mivel a szimulált torzult E/c görbét mi állítottuk elő egy szimulált torzítatlan E/c görbéből, a „valóságúen” korrigált E/c görbét össze tudtuk hasonlítani a neki megfelelő torzítatlan E/c görbével.

### 3.1.2. Alkalmazott matematikai eszközök

1. A torzítatlan E/c görbék megszerkesztéséhez az agonizmus operatív modelljét alkalmaztuk, mint a receptorfunkció általános érvényű modelljét, ami az empirikus és a mechanisztikus modellek közötti átmenetnek fogható fel (Roche és mtsai, 2014). Ennek a modellnek két egyenletét használtuk: azt, amelyik egyetlen agonista hatását határozza meg (Black és Leff, 1983) és azt, amelyik két agonista együttes hatását írja le (Leff és mtsai, 1993). Ez utóbbi egyenletben az egyik agonistát egyetlen koncentrációval szerepeltettük (torzító koncentráció), míg a másikat több (növekvő) koncentrációval vettük figyelembe (E/c görbe szimuláció). Az egy agonista hatását leíró egyenlettel létrehozott függvények az egyszerű, torzítatlan E/c görbéket jelentették meg, míg a két agonista együttes hatásának egyenlete volt felelős az összetett, torzítatlan E/c görbék szimulációjáért (amelyek könnyen eltorzíthatóak az egyetlen koncentrációban alkalmazott agonista figyelmen kívül hagyásával). Az egyetlen koncentrációban alkalmazott agonista az NBTI által interstitialisan felhalmozott endogén adenzint modellezte, míg a másik, növekvő koncentrációkban figyelembe vett agonista az E/c görbe felvételéhez használt agonistát szimulálta.

2. A függvények görbeillesztéssel való geometriai jellemzéséhez, illetve a hatás értékek kiszámításához, koncentrációkból és korábbi görbeillesztéssel kapott Hill paraméterekből, a Hill egyenletet használtuk, ami a legszélesebb körben alkalmazott empirikus receptor funkciók modell (Gesztelyi és mtsai, 2012).

3. Az adenzint egy A, míg a CPA-t B elnevezésű agonistával modelleztük. Ennek megfelelően az A agonista esetében folyamatos extracelluláris termelést, intracelluláris eliminációt és membrán transzportot tételeztünk fel. Így az „exogén” A agonista koncentrációkat (az A agonistával felvett E/c görbék szimulálásakor) annak

megfelelően állítottuk be, hogy éppen milyen nukleozid transzporter funkciót modelleztünk (lásd 5. pont). A nukleozid transzport gátlására adott válaszként többlet „endogén” A agonista koncentrációt is bevezettünk (az egyszerűség kedvéért a modellünkben csak ENT1-et modellező nukleozid transzporter szerepelt). Ezzel szemben a B agonista koncentrációkat állandónak tekintettük a beadásuk után (lásd 5. pont).

4. Az NBTI-t egy ún. transzport inhibitor (TI), az FSCPX-et pedig egy ún. irreverzibilis antagonistát (IA) modellezte.

5. Az agonista koncentrációkat két kompartmentben értelmeztük. A szervkádbeli koncentrációkat minden „exogén” agonista esetében függetlennek tekintettük bármilyen szimulált kezeléstől. Az E/c görbék megszerkesztésekor a hatás értékeket mindig a szervkádbeli koncentrációkhoz rendelve ábrázoltuk (szimulálva azt, hogy általában csak ezek a koncentrációk ismertek az *ex vivo* kísérletek során). A hatás értékeket ugyanakkor mindig az alábbiakban definiált receptorközeli agonista koncentrációkból számítottuk. A szervkádbeli koncentrációt egyenlőnek tekintettük a receptorközeli koncentrációval a B agonista esetében (minden körülmények között), továbbá az A agonista esetén TI jelenlétében, de IA előkezelés nélkül (szimulálandó a teljes ENT1 gátlást). Az A agonista szervkádbeli koncentrációját 400-zal elosztva számoltuk ki az A agonista receptorközeli koncentrációját TI és IA előkezelés hiányában (szimulálandó a fiziológiásan működő ENT1-et). Végezetül, az A agonista szervkádbeli koncentrációjának 3-mal való elosztásával számítottuk az A agonista receptorközeli koncentrációját TI jelenlétében és IA előkezelés után (szimulálandó az ENT1 részleges gátlását). Ezek az egyszerű műveletek az ENT1 hatását szimulálták a sejt felszíni A<sub>1</sub> receptorok közelében levő adenzin koncentrációjára, melynek következtében az A agonista kezeletlen E/c görbéje párhuzamos balra tolódást szenved el a B agonista kezeletlen E/c görbéjéhez képest. Ez összhangban áll azzal, hogy az adenzin és a CPA (két A<sub>1</sub> receptor agonista) gyakorlatilag ugyanazzal az E<sub>max</sub> értékkel, de nagyon eltérő EC<sub>50</sub> értékkel rendelkeznek direkt negatív inotróp hatásuk tekintetében (Karsai és mtsai, 2006).

6. A fentiekkel összhangban, amikor az exogén A agonista receptorközeli koncentrációját számoltuk a szervkádbeliből, a TI jelenlétét úgy szimuláltuk, hogy elhagytuk a 400-zal való osztást. Emellett TI jelenlétekor bevezettünk egy többlet receptorközeli koncentrációt is az endogén A agonistából (lásd a 3. és 7. pont).

7. Az IA előkezelést úgy szimuláltuk, hogy a teljes receptor koncentrációt ( $[R_0]$ ) 5-tel elosztottuk (lásd lentebb). Ily módon, korábbi FSCPX-szel szerzett eredményeinkkel

összhangban (Gesztelyi és mtsai, 2013), azt feltételeztük, hogy az A<sub>1</sub> receptorok 20%-a marad működőképes. Az IA és a TI együttes hatását (interakcióját) úgy vettük figyelembe, hogy az A agonista receptorközeli koncentrációjának meghatározásához egyrészt az exogén A agonista szervkádbeli koncentrációját 3-mal elosztottuk, másrészt 3-mal osztottuk azt a többlet endogén A agonista koncentrációt is, amellyel a(z önmagában végzett) TI kezelés hatását szimuláltuk (lásd a 3. és 6. pont).

8. A torzult E/c görbék szimulálása céljából a torzítatlan hatás értékeket torzulttá alakítottuk az RRM kiindulási egyenlete segítségével (8. egyenlet, lásd alább) (Gesztelyi és mtsai, 2004; Greczer és mtsai, 2010).

9. A torzított hatás értékek korrekciójához az RRM-et alkalmaztuk a korábban leírtak szerint (Kiss és mtsai, 2013). Röviden: a B agonista torzult E/c görbéire az RRM kombinált egyenletét (13. egyenlet) illesztettük, amellyel meghatároztuk az endogén A agonista receptorközeli többletével ekvifektív B agonista koncentrációt (c<sub>x</sub>). Ezzel és a B agonista egyszerű, torzítatlan E/c görbéinek Hill paramétereivel korrigáltuk a torzított hatás értékeket, amihez a 8. egyenlet átrendezett formáját vettük igénybe.

### 3.1.3. Első lépés: egyszerű, torzítatlan E/c görbék szimulációja és elemzése

Két rendszert és két agonistát (A, B) határoztunk meg az agonizmus operatív modelljével az alábbi egyenlet alapján (megfeleltethető a 7. egyenletnek):

$$E = E_{\max} \cdot \frac{[R_0]^{n_{op}} \cdot c^{n_{op}}}{K_E^{n_{op}} \cdot (K_A + c)^{n_{op}} + [R_0]^{n_{op}} \cdot c^{n_{op}}} \quad 10. \text{ egyenlet}$$

Ahol: E – a hatás; E<sub>max</sub> – a lehetséges maximális hatás; [R<sub>0</sub>] – a teljes receptor koncentráció; c – az agonista receptorközeli koncentrációja; K<sub>A</sub> – az agonista-receptor komplex egyensúlyi disszociációs állandója (az agonista affinitás mérőszáma); K<sub>E</sub> – az agonista hatékonyság mérőszáma; n<sub>op</sub> – az operatív meredekségi tényező.

Több érték kombináció tesztelése után a következő paramétereket állandó értéken rögzítettük a szimuláció során (a végső *in silico* modell jellemzői): E<sub>max</sub> = 100, K<sub>A</sub> = 3 · 10<sup>-5</sup>, K<sub>E</sub> = 5 · 10<sup>-14</sup> és n<sub>op</sub> = 0,7.

Az A agonista és a B agonista szervkádbeli koncentrációja 10<sup>-10</sup> és 3,1623 · 10<sup>-3</sup> között volt (ezek logaritmusai -10, illetve -2,5). A receptorközeli koncentrációkat (a 10.

egyenlet c értékei) a szimulált agonisták és kezelések jellege alapján számítottuk ki (lásd az előző alfejezetet).

A két rendszert az egyenletben két különböző  $[R_0]$  értékkel határoztuk meg:  $10^{-10}$  és  $2 \cdot 10^{-11}$ , melyek FSCPX előkezelés nélküli és FSCPX előkezelt pitvarmintákat modelleznek (azaz teljes vagy csökkentett  $A_1$  receptor populációval rendelkező preparátumokat).

Az 10. egyenlettel kiszámított hatás értékeket az adott agonista szervkádbeli koncentrációinak függvényében ábrázoltuk. Az E/c görbékre ezután a Hill egyenletet (3. egyenlet) illesztettük logaritmikus formában (Gesztelyi és mtsai, 2012):

$$E = \frac{E_{\max}}{1 + 10^{n \cdot (\log EC_{50} - \log c)}} \quad 11. \text{ egyenlet}$$

Ahol: E – a hatás;  $E_{\max}$  – az adott agonista által az adott rendszerben kiváltható maximális hatás;  $EC_{50}$  – a maximális hatás feléhez tartozó agonista koncentráció; n – Hill koefficiens (meredekségi tényező); c – az adott agonista szervkádbeli koncentrációja.

A szervkádbeli koncentráció használata a 11. egyenletben a biológiai mintákon szokásos görbeillesztési gyakorlatnak megfelelően történt. A továbbiakban a B agonistával felvett E/c görbék Hill paramétereit használtuk (lásd alább).

#### 3.1.4. Második lépés: torzítatlan hatás értékek kiszámítása egy későbbi torzító transzformációhoz

Az endogén A agonista többlet koncentrációja és a vele együtt jelen levő exogén A agonista vagy B agonista által kiváltott hatást az operatív modell kiterjesztett egyenletével (Leff és mtsai, 1993) számoltuk ki (azon E/c görbék esetében, amelyek felvételét TI jelenlétében terveztük modellezni):

$$E = E_{\max} \cdot \frac{(\tau_{\text{test}} \cdot c_{\text{test}} \cdot K_{\text{bias}} + \tau_{\text{bias}} \cdot c_{\text{bias}} \cdot K_{\text{test}})^{n_{op}}}{(c_{\text{test}} \cdot K_{\text{bias}} + K_{\text{test}} \cdot K_{\text{bias}} + c_{\text{bias}} \cdot K_{\text{test}})^{n_{op}} + (\tau_{\text{test}} \cdot c_{\text{test}} \cdot K_{\text{bias}} + \tau_{\text{bias}} \cdot c_{\text{bias}} \cdot K_{\text{test}})^{n_{op}}} \quad 12. \text{ egyenlet}$$

Ahol: E – a hatás;  $E_{\max}$  – az adott rendszerben kiváltható maximális hatás;  $c_{\text{bias}}$  – a többlet endogén A agonista receptorközeli koncentrációja (ami a TI-ra adott válasz része);  $c_{\text{test}}$  – az exogén A vagy B agonista receptorközeli koncentrációja;  $K_{\text{bias}}$  és  $K_{\text{test}}$  – a  $c_{\text{bias}}$  és a  $c_{\text{test}}$  agonistáinak  $K_A$  értékei (a végső modellben:  $K_{\text{bias}}$

$= K_{\text{test}} = 3 \cdot 10^{-5}$ );  $\tau_{\text{bias}}$  és  $\tau_{\text{test}} = [R_0]/K_{E_{\text{bias}}}$  és  $[R_0]/K_{E_{\text{test}}}$ , ahol  $K_{E_{\text{bias}}}$  és  $K_{E_{\text{test}}}$  a  $c_{\text{bias}}$  és a  $c_{\text{test}}$  agonistáinak  $K_E$  értékei (a végső modellben:  $K_{E_{\text{bias}}} = K_{E_{\text{test}}} = 5 \cdot 10^{-14}$ ).

Amikor a  $c_{\text{test}}$  értékeket az A agonistával szimuláltuk, a számításokat mindkét  $[R_0]$  értékekkel ( $10^{-10}$  és  $2 \cdot 10^{-11}$ ) elvégeztük. Amikor a  $c_{\text{test}}$  a B agonista koncentrációja volt, csak az  $[R_0] = 10^{-10}$  értékkel számoltunk (a modellezés célkitűzésének megfelelően).

A 12. egyenlet alkalmazásával az NBTI által felhalmozott többlet endogén adenzin és az E/c görbe felvételéhez beadott agonista (adenozin vagy CPA) közös hatását szimuláltuk. Az NBTI (vagyis TI) önmagában vett hatását úgy modelleztük, hogy egyrészt egy önkényes  $c_{\text{bias}}$  értéket vezettünk be a szimulációba, másrészt kihagytuk az A agonista szervkádbeli koncentrációjának 400-zal történő elosztását (ez szolgáltatta a receptorközeli  $c_{\text{test}}$  értékeket). Amikor a TI-t az IA-val együtt alkalmazták, az IA-nak a TI működésére gyakorolt feltételezett hatását úgy vettük figyelembe, hogy a  $c_{\text{bias}}$  eredetileg meghatározott értékének harmadával számoltunk, valamint az A agonista szervkádbeli koncentrációjának is a harmadával (ami a receptorközeli  $c_{\text{test}}$  értéket adta). A végső modellben a  $c_{\text{bias}}$ -t  $4 \cdot 10^{-7}$  értéken rögzítettük, amikor a TI-t önmagában alkalmaztuk, míg  $(4 \cdot 10^{-7})/3$  értékkel számoltunk, amikor az IA előkezelés után adott TI-t szimuláltuk.

Az A agonistának a 12. egyenlettel kapott torzítatlan E/c görbéi mintegy „beépített kontrollként” szolgáltak, amikor összehasonlítottuk azokat az A agonista korigált E/c görbéivel (lásd alább). Ez a gyorsan bomló agonisták receptor rezervjének meghatározására szolgáló, korábban közölt módszerünk (Kiss és mtsai, 2013) validálása céljából történt. A B agonista torzítatlan E/c görbéjét, amelyet szintén a 12. egyenlettel kaptunk, az A agonistával előállított torzított E/c görbék korrekciójára használtuk fel (lásd lentebb).

### 3.1.5. Harmadik lépés: torzult E/c görbék létrehozása és elemzése

A 12. egyenlettel kiszámított hatás értékeket a korábban már bemutatott 8. egyenlet segítségével transzformáltuk („torzítottuk”):

$$E' = 100 - \frac{100 \cdot (100 - E)}{100 - E_{\text{bias}}} \quad \text{8. egyenlet}$$

Ahol:  $E'$  – a torzult hatás;  $E$  – a torzítatlan hatás (amelyet a 12. egyenlet szolgáltatott);  $E_{\text{bias}}$  – a  $c_{\text{bias}}$  által kiváltott hatás (amit szintén a 12. egyenlettel

számoltunk oly módon, hogy a  $c_{\text{test}}$  értékét nullára állítottuk, míg más paraméterek értéke változatlan maradt).

A torzítatlan hatás értékek torzítását a 8. egyenlet segítségével végeztük a  $c_{\text{bias}}$  és a hozzá tartozó  $E_{\text{bias}}$  felhasználásával. A 8. egyenlettel számolt torzult hatás értékeket a kérdéses  $c_{\text{test}}$ -hez tartozó agonista szervkádbeli koncentrációinak függvényében ábrázoltuk.

A torzítással azok az E/c görbék, amelyek felvételét TI jelenlétében modelleztük, elkészültek. A továbbiakban az ezeket a görbéket érintő műveletek célja már az elemzés volt. Az A agonista torzult E/c görbéire a Hill-egyenletet (11. egyenlet) illesztettük, a B agonista torzult E/c görbéjére pedig az RRM kombinált egyenletét (a 9. egyenlet görbeillesztéshez optimalizált formáját):

$$E' = 100 - \frac{100 \cdot \left( 100 - \frac{E_{\max}}{1 + 10^{n \cdot (\log EC_{50} - \log(10^{\log c_x} + 10^{\log c_{\text{test}}})})}} \right)}{100 - \frac{E_{\max}}{1 + 10^{n \cdot (\log EC_{50} - \log c_x)}}} \quad 13. \text{ egyenlet}$$

Ahol:  $E'$  – a torzult hatás;  $c_x$  – a B agonista azon koncentrációja, amely várhatóan ekvifektív a  $c_{\text{bias}}$ -szel, az endogén A agonista receptorközeli koncentrációjának többletével;  $E_{\max}$ ,  $\log EC_{50}$ ,  $n$  – a 11. egyenlet paraméterei, amelyek az intakt receptor populációval rendelkező rendszerben a B agonistával felvett egyszerű, torzítatlan E/c görbe geometriáját tükrözik. Ez utóbbi adatok felhasználásával a biológiai vizsgálatok során használt protokollt követtük.

### 3.1.6. Negyedik lépés: korigált E/c görbék létrehozása az A agonista torzult E/c görbéiből

A  $c_x$ -hez tartozó hatás értékeket a Hill egyenlettel számítottuk ki (a 3. egyenlet módosított formájával):

$$E_x = E_{\max} \cdot \frac{c_x^n}{c_x^n + EC_{50}^n} \quad 14. \text{ egyenlet}$$

Ahol:  $E_x$  – a  $c_x$  által kiváltott hatás;  $c_x$  – az a B agonista koncentráció, amely várhatóan ekvivalens a  $c_{\text{bias}}$ -szel;  $E_{\max}$ ,  $EC_{50}$ ,  $n$  – a B agonista egyszerű, torzítatlan E/c görbéire illesztett 11. egyenlet paraméterei (mindkét rendszerben, vagyis intakt és depletált receptorszám mellett is). Ez utóbbi paraméterek a B agonista és

a két rendszer közötti E/c kapcsolatot tükrözik (oly módon, ahogy az biológiai vizsgálatok során is hozzáférhető).

Az  $E_x$  azt a hatást modellezte, amit az NBTI által felhalmozott többlet endogén adenozin vált ki a biológiai rendszerben. Amikor az  $E_x$ -et az intakt receptor populációjú rendszerre számoltuk ki, a B agonista intakt receptorszámú rendszerben megszerkesztett egyszerű, torzítatlan E/c görbéjének Hill paramétereit helyettesítettük be a 14. egyenletbe. Amikor az  $E_x$ -et a csökkentett receptorszámú rendszerben számítottuk ki, a B agonista csökkentett receptor populációjú rendszerben létrehozott egyszerű, torzítatlan E/c görbéjének Hill paramétereit használtuk a 14. egyenlethez.

A 8. egyenlet révén torzított hatás értékeket (amikor is az A agonista adta a  $c_{\text{test}}$ -et) a 8. egyenlet átrendezett formájával korrigáltuk:

$$E_{\text{corr}} = 100 - \frac{(100 - E') \cdot (100 - E_x)}{100} \quad 15. \text{ egyenlet}$$

Ahol:  $E_{\text{corr}}$  – a korrigált hatás, amely a várakozás szerint megegyezik a neki megfelelő torzítatlan hatással;  $E'$  – a torzult hatás;  $E_x$  – a  $c_x$  által kiváltott hatás.

A 15. egyenlettel kapott korrigált hatás értékeket az A agonista szervkádbeli koncentrációinak függvényében ábrázoltuk.

### 3.1.7. Számítógépes szimuláció és adatelemzés

Az agonista koncentrációk, az  $EC_{50}$  és a  $c_x$  értékek a görbeillesztésére használt egyenletekben 10-es alapú logaritmusként szerepeltek az ajánlás szerint (GraphPad Software, 2016). Az egyszerű számításokat Microsoft Excel 2013 segítségével végeztük (Microsoft Co., Redmond, WA, USA). A görbék szerkesztését és regresszióanalízisét GraphPad Prism 7.03 for Windows (GraphPad Software Inc., La Jolla, Kalifornia, USA) szoftverrel végeztük.

## 3.2. *Ex vivo* módszerek

### 3.2.1. *Vegyszerek és oldatok*

Kísérleteink során az alábbi vegyszereket használtuk: adenzin, CPA (N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine), NBTI (S-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine) és FSCPX (8-cyclopentyl-N<sup>3</sup>-[3-(4-(fluorosulfonyl)benzoyloxy)propyl]-N<sup>1</sup>-propylxanthine), melyeket a Sigma-tól (St. Louis, MO, USA) vásároltunk.

Az adenzint 36°C-os módosított Krebs-Henseleit pufferben (Krebs-oldat) oldottuk fel. A Krebs-oldat összetétele a következő volt (az értékek mM-ban kifejezve értendők): NaCl: 118, KCl: 4.7, CaCl<sub>2</sub>: 2.5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1, MgCl<sub>2</sub>: 1.2, NaHCO<sub>3</sub>: 24.9, glükóz: 11.5, aszkorbinsav: 0.1, mindez bidesztillált vízben oldva. A CPA-t 36°C-os 1:4 (v/v) etanol:víz elegyben oldottuk. Az FSCPX és az NBTI oldószereként dimetil-szulfoxidot (DMSO) használtunk. Minden törzsoldat koncentrációja 10 mM volt, kivéve azt az adenzin törzsoldatot, amelyet a 3 mM-os szervkádbeli koncentráció kialakítására alkalmaztunk (erre a célra 20 mM-os adenzin törzsoldatot használtunk, amelyet frissen készítettünk, közvetlenül a felhasználás előtt).

A törzsoldatok hígításához Krebs-oldatot használtunk. A DMSO szervkádbeli koncentrációja sosem haladta meg a 0.1%-ot (v/v).

### 3.2.2. *Állatok és preparátumok*

Kísérleteinkhez 600-800 g testtömegű, hím, Hartley tengerimalacokat használtunk fel. Az állatok tartását és feldolgozását a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága hagyta jóvá és megfelelt a vonatkozó Európai Unió elõírásoknak (DE MÁB 25/2013.).

A tengerimalacokat dekapitáltuk, majd a bal pitvarokat gyorsan eltávolítottuk és 10 mN nyugalmi feszülés mellett rögzítettük a 10 ml Krebs oldatot tartalmazó, függõleges kiképzésû szervkádban (Experimetria TSZ-04; Experimetria Kft, Budapest, Magyarország). A Krebs-oldatot karbogénnel (95% O<sub>2</sub> és 5% CO<sub>2</sub>) oxigenizáltuk (pH=7,4; 36 °C). A bal pitvarokat platinaelektrodok segítségével pontszerûen ingereltük (1 V, 3 Hz, 1 ms), melyet a felhelyezést követõen azonnal megkezdtünk a programozható stimulátor (Experimetria ST-02; Experimetria Kft, Budapest, Magyarország) és teljesítmény-erõsítõ

(Experimetria PST-02; Experimetria Kft, Budapest, Magyarország) segítségével. A kontrakciós erőt az izometriás összehúzódások amplitúdójával jellemeztük, amit transzducerrel (Experimetria SD-01; Experimetria Kft, Budapest, Magyarország) és jelerősítővel (Experimetria SG-01D; Experimetria Kft, Budapest, Magyarország) mértünk, valamint hőirókaros poligráffal (Medicor R-61 6CH Recorder; Medicor Művek, Budapest, Magyarország) rögzítettünk.

### 3.2.1. Kísérleti protokollok és csoportok

	Első inkubáció	Első E/c görbe	Második inkubáció	Második E/c görbe	Harmadik inkubáció	Harmadik E/c görbe
<b>P1a</b>			Krebs oldat 20 perc; 10 µL DMSO 15 perc	CPA (0.1 nM–0.1 mM) /NBTI-kezelt és a kontrollja/		
<b>P1b</b>			Krebs oldat 20 perc; 10 µM NBTI 15 perc			
<b>P2a</b>		adenozin (1 nM–3 mM) /összehasonlítani a P3 és P4 csoportok első adenozin E/c görbéjével/	Krebs oldat 20 perc; 10 µL DMSO 45 perc; Krebs oldat 60 perc; 10 µL DMSO 15 perc	CPA (0.1 nM–0.1 mM) /FSCPX előkezelt, FSCPX+NBTI kezelt és a kontrolluk/		
<b>P2b</b>	Krebs oldat 25 perc; 100 µM adenozin 2 perc; Krebs oldat 20 perc		Krebs oldat 20 perc; 10 µM FSCPX 45 perc; Krebs oldat 60 perc; 10 µL DMSO 15 perc			
<b>P2c</b>			Krebs oldat 20 perc; 10 µM FSCPX 45 perc; Krebs oldat 60 perc; 10 µM NBTI 15 perc			
<b>P3</b>			Krebs oldat 20 perc; 10 µM FSCPX 45 perc; Krebs oldat 75 perc	adenozin (1 nM–3 mM) /FSCPX előkezelt/		
<b>P4</b>		adenozin (1 nM–3 mM) /kontroll/	Krebs oldat 20 perc; 10 µM NBTI 15 perc	adenozin (1 nM–3 mM) /NBTI kezelt /	Krebs oldat 20 perc; 10 µM FSCPX 45 perc; Krebs oldat 60 perc; 10 µM NBTI 15 perc	adenozin (1 nM–3 mM) /FSCPX+NBTI kezelt/

1. táblázat. A hét csoportot meghatározó hét protokoll és az azokhoz kapcsolódó E/c görbék. P1a, P1b, P2a, P2b, P2c, P3 és P4: protokoll és csoport azonosítók; CPA: N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine; FSCPX: 8-cyclopentyl-N<sup>3</sup>-[3-(4-(fluorosulfonyl)benzoxy)propyl]-N<sup>1</sup>-propylxanthine; NBTI: S-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine.

A kísérlet során felhasznált pitvarokat hét csoportra osztottuk (P1a, P1b, P2a, P2b, P2c, P3 és P4; n = 6-10) az alkalmazott hét kísérleti protokoll szerint. A protokollok megegyeztek a

korábbi, hasonló vizsgálatainkhoz használtakkal (Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014), kivéve a protokollok számozását és egy új, P2c jelzésű protokoll bevezetését, amelyet a jelen disszertációt megalapozó *ex vivo* vizsgálatok során először alkalmaztunk (1. táblázat).

A protokollok két vagy három inkubációs periódust foglaltak magukba. Az első, második és (esetleges) harmadik inkubációs periódust a csoportokra jellemző első, második és (esetleges) harmadik E/c görbe felvétele követte.

### 3.2.4 Az E/c görbék kiértékelése

Kiértékeléskor az egymás után regisztrált egyedi rángások amplitúdójának két végpontja közötti távolságot tekintettük a kontrakciós erőnek. Értelemszerűen minél nagyobb ez a távolság (tehát minél nagyobb az amplitúdó), annál nagyobb a kontrakciós erő. Az E/c görbe felvételekor először a legkisebb koncentrációjú agonista oldat beadás előtt megmértük a pitvarok kiindulási kontrakciós erejét, majd az adott koncentrációjú agonista oldatok beadása után megkerestük a kialakult legkisebb kontrakciós erőt és ezt használtuk fel a hatás (direkt negatív inotrópia) kiszámolásához. Hatásként a pitvarok kiindulási kontrakciós erejének százalékos csökkenését definiáltuk és az alábbi egyenlettel számoltuk:

$$E = \frac{F_0 - F}{F_0} \cdot 100\% \quad 16. \text{ egyenlet}$$

Ahol: E – a kontrakciós erő százalékos csökkenése;  $F_0$  – a kiindulási kontrakciós erő; F – egy adott agonista koncentráció jelenlétében kialakuló legkisebb kontrakciós erő.

Az E/c görbék empirikus jellemzésére a Hill egyenletet illesztettük (11. egyenlet) mind az egyedi, mind átlagolt E/c görbékre. Átlagolás során a használt statisztikai szoftver képezte az összetartozó E/c görbék azonos koncentrációhoz tartozó hatás értékeinek számtani közepét és szórását (SEM). (Kísérleteink folyamán az ugyanazon kísérleti protokoll ugyanazon fázisában felvett E/c görbék tartoztak össze.) Az egyedi E/c görbék Hill paramétereit ( $E_{\max}$ ,  $EC_{50}$ , n) statisztikai analízisre, ezáltal a csoportok összehasonlítására használtuk, míg néhány csoport esetében az átlagolt E/c görbék empirikus paraméterei a torzult E/c görbék matematikai korrekciójához kellettek.

### 3.2.5. A CPA E/c görbék NBTI okozta torzulásának kvantifikálása

Az NBTI, mint szelektív ENT1 inhibitor, jól oxigenizált körülmények között növeli az endogén adenzin interstitialis koncentrációját a pitvarban (Karsai és mtsai, 2006, 2007). Ez az akut koncentráció többlet minden NBTI jelenlétében felvett E/c görbénket torzította, mivel már a görbék felvétele előtt kifejtette a hatását, amit nem vettünk figyelembe az E/c görbék kiértékelése során. Ezt az interstitialis endogén adenzin többletet számszerűsíteniünk kellett ahhoz, hogy az általa okozott torzulást korigálni tudjuk. A többlet interstitialis adenzin szint kvantifikálására az RRM-et használtuk oly módon, hogy a P1b (NBTI kezelt) csoport átlagolt CPA E/c görbéire illesztettük a 13. egyenletet, amely a P1a csoport átlagolt CPA E/c görbéjének Hill paramétereit tartalmazta:

$$E' = 100 - \frac{100 \cdot \left( 100 - \frac{E_{\max}}{1 + 10^{n \cdot (\log EC_{50} - \log(10^{\log c_x} + 10^{\log c_{test}}))}} \right)}{100 - \frac{E_{\max}}{1 + 10^{n \cdot (\log EC_{50} - \log c_x)}}} \quad 13. \text{ egyenlet}$$

Ahol:  $E'$  – a torzult hatás (a régi módszer szerint);  $E_{\max}$ ,  $EC_{50}$ ,  $n$  – a megfelelő CPA E/c görbe Hill paramétere, amelyek leírják a natív, azaz NBTI-mentes E/c viszonyokat;  $c$  – a CPA koncentrációja (az E/c görbe felvétele során bemért);  $c_x$  – a 13. egyenlet regressziós paramétere, amely az NBTI által felhalmozott interstitialis adenzinnal ekvifektív CPA koncentrációt adja meg.

Ezen egyenlet segítségével megkaptuk a P1b csoporthoz tartozó  $c_x$ -et, vagyis az NBTI hatására felszaporodó, torzító hatást kiváltó adenzinnal ekvifektív CPA koncentrációt. Ezt követően a régi módszer szerint ebből a  $c_x$  értékből kiindulva korigáltuk mind az adenzinnal felvett NBTI, mind az adenzinnal felvett FSPCX-NBTI E/c görbékét. A régi módszer kidolgozásakor (Kiss és mtsai, 2013) azonban még nem tudtuk, amire az előbbieken ismertetett *in silico* vizsgálat derített fényt, hogy az FSPCX feltehetően befolyásolja az NBTI hatását *ex vivo* kísérleti rendszerünkben.

### 3.2.6. Az adenzin E/c görbék NBTI miatt torzult hatás értékeinek korrekciója a régi módszerrel

Régi módszerünk azon a korábbi feltételezésen alapul, hogy az NBTI ugyanakkora interstitialis adenzin koncentráció növekedést okoz az FSPCX előkezelt és az attól mentes

pitvarokon. Ez alapján egyetlen  $c_x$  értéket határoztuk meg úgy, hogy a 13. egyenletet illesztettük a P1b csoport átlagolt CPA E/c görbéjére (az egyenlet a P1a csoport átlagolt CPA E/c görbéjének Hill paramétereit tartalmazta). Ezt a  $c_x$  értéket behelyettesítettük a Hill egyenletbe és így megkaptuk a  $c_x$  értékhez tartozó torzító hatást ( $E_x$ ):

$$E_x = E_{\max} \cdot \frac{c_x^n}{c_x^n + EC_{50}^n}$$

Ahol:  $E_x$  – a torzító hatás, amelyet a többlet interstitialis adenzin vált ki;  $c_x$  – a 13. egyenlettel kapott ekvifektív CPA koncentráció;  $E_{\max}$ ,  $EC_{50}$ ,  $n$  – a megfelelő csoport (P1a vagy P2b) átlagolt CPA E/c görbéjének Hill paramétere.

Így meghatároztuk az NBTI által akkumulált többlet interstitialis adenzin torzító hatását ( $E_x$ ) FSCPX előkezelés mellett és anélkül. Ahhoz, hogy megkapjuk az adenzinnal felvett torzult E/c görbék korrigált hatását, a 15. egyenletet alkalmaztuk (ami lényegében a 8. egyenlet átrendezett alakja):

$$E_{\text{corr}} = 100 - \frac{(100 - E') \cdot (100 - E_x)}{100} \quad 15. \text{ egyenlet}$$

Ahol:  $E_{\text{corr}}$  – az átlagolt P4 NBTI vagy P4 FSCPX-NBTI görbékhez tartozó korrigált hatás;  $E'$  – az átlagolt P4 NBTI vagy P4 FSCPX-NBTI görbék hagyományosan számolt hatás értéke, melyet torzult hatásnak tekintettünk;  $E_x$  – az NBTI által felhalmozott többlet interstitialis adenzin hatása intakt és FSCPX-szel depletált  $A_1$  adenzin receptor populáción mérve.

### 3.2.7. Az adenzin E/c görbék NBTI miatt torzult hatás értékeinek korrekciója az új módszerrel

Az új módszer alapja ugyanaz, mint a régi módszeré. A különbség abban rejlik, hogy míg korábban az NBTI hatását az adenzin receptor agonisták E/c görbéjére függetlennek gondoltuk az FSCPX előkezeléstől, *in silico* kutatásunkban fény derült az FSCPX és az NBTI lehetséges interakciójára. Emiatt számolni kell az FSCPX előkezelés hatásával az NBTI kezelés hatására, különben a torzult E/c görbék korrekciója során téves eredményt kaphatunk. Ebből kiindulva hoztuk létre a P2c csoportot, melynek segítségével figyelembe tudjuk venni az FSCPX és az NBTI esetleges kölcsönhatását (hatásaik szintjén).

Az egyedül (FSCPX előkezelés nélkül) alkalmazott NBTI okozta adenosin többlettel ekvieffektív CPA koncentrációt ( $c_x$ -et) az új módszer szerint is a P1b (NBTI kezelt) csoport átlagolt CPA E/c görbéire illesztett 13. egyenlet adja meg (melybe a P1a csoport átlagolt CPA E/c görbéjének Hill paraméterei vannak beírva). Ezzel a  $c_x$  értékkel azonban csak az adenzinnal felvett NBTI E/c görbét korrigáltuk. A P2b (kizárólag FSCPX-szel kezelt) csoport átlagolt CPA E/c görbéjének Hill paramétereit tartalmazó 13. egyenletet a P2c (FSCPX és NBTI együtt kezelt) csoport átlagolt CPA E/c görbéjére illesztve ugyanakkor megkaptuk azt a  $c_x$  értéket, ami azzal az endogén adenosin többlettel ekvieffektív CPA koncentrációt becsli, ami FSCPX előkezelés után halmozódik fel NBTI jelenlétében. Az új módszer szerint ezzel a  $c_x$  értékkel korrigáltuk az adenzinnal felvett FSCPX-NBTI E/c görbét.

### 3.2.8. Adatelemzés

Mindegyik pitvarnak meg kellett felelnie három kritériumnak annak érdekében, hogy bekerüljön a statisztikai értékelésbe (tehát csak azon pitvarok adatait dolgoztuk fel, amelyeken teljesülnek az alábbi feltételek):

1. a nyugalmi kontrakciós erőnek minimum 1 mN-nak kellett lennie az első E/c görbe felvétele előtt
2. az ingerelt pitvar mechanikai aktivitásának szabályosnak kellett lennie
3. az első adenosin E/c görbe  $10^{-4}$  M adenosin koncentrációval szembeni válaszában a számtani közép  $\pm 2$  SD intervallumon belül kellett lennie. Az átlagot és az SD-t az első két kritériumnak megfelelő pitvarok felhasználásával számoltuk. A három kritériumnak megfelelő pitvarokon kapott összes kísérleti eredményt feldolgoztuk.

Az ajánlás szerint a görbék illesztéséhez használt egyenletekben a koncentrációkat ( $c$ , mint a beadott agonista koncentráció;  $EC_{50}$ ;  $c_x$ ) tízes alapú logaritmusként szerepeltettük (GraphPad Prism Software, 2016). Az adatok eloszlását Shapiro-Wilk normalitás tesztel vizsgáltuk. Két adathalmazt, ha mindkettő megfelelt a normalitás tesztnek, párosítatlan t-próbával hasonlítottuk össze. Ha nem felelt meg, Mann-Whitney U-tesztet használtunk. Több mint két adathalmaz összehasonlítását Tukey post-tesztel kombinált egyszempontú varianciaanalízissel (ANOVA, Geisser-Greenhouse korrekcióval) végeztük. A csoport átlagok (vagy mediánok) különbségét  $p < 0.05$  esetén tekintettük szignifikánsnak.

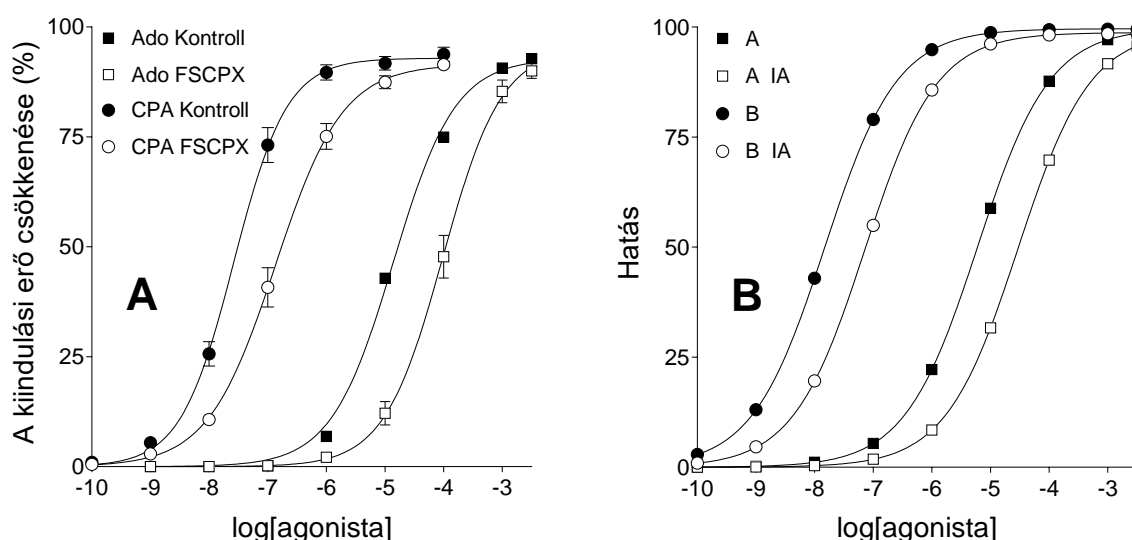
A statisztikai elemzéshez és a görbeillesztéshez a GraphPad Prism 7.04 szoftvert használtuk Windows 7 és 10 operációs rendszeren (GraphPad Software Inc., La Jolla, California, USA). A többi számítást Microsoft Office Excel 2016 szoftverrel végeztük (Microsoft Co., Redmond, WA, USA).

## 4. Eredmények

### 4.1. *In silico* eredmények

#### 4.1.1. Az A és B agonisták egyszerű, torzítatlan E/c görbéinek jellemzői

Az A agonista (adenozint szimuláló) és a B agonista (CPA-t szimuláló) IA (FSCPX szimuláció) nélküli, vagyis intakt receptor populációval rendelkező rendszerben szimulált E/c görbéinek alakja és pozíciója igen hasonló azokhoz az adenzin és CPA E/c görbékhez, melyek FSCPX előkezelés nélküli tengerimalac pitvaron lettek felvéve korábbi kísérletek során. A receptorszám szimulált csökkenése az A és B agonista E/c görbéinek mérsékelt jobbra tolódását eredményezte, hasonlóan a 10  $\mu\text{mol/L}$  FSCPX előkezelés (45 perc inkubáció, majd 75 perc mosás) után felvett adenzin és CPA E/c görbékhez (10. ábra).

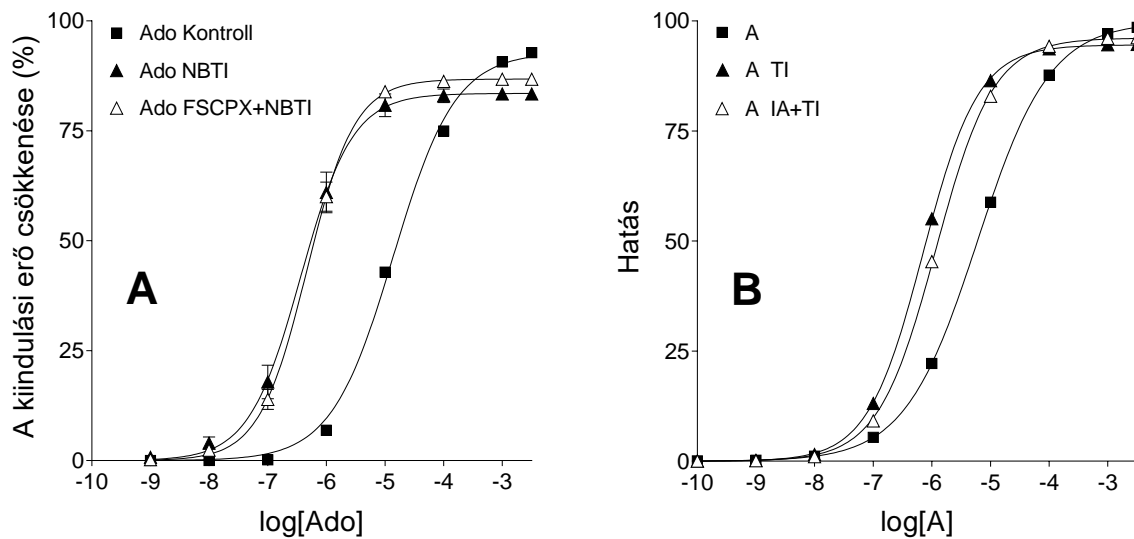


10. ábra. *Ex vivo* kísérletekből származó (A panel) és *in silico* szimulált (B panel) rövid (négyzet szimbólum) és hosszú (kör szimbólum) felezési idejű agonisták koncentráció-hatás (E/c) görbéi intakt (kitöltött szimbólumok) és csökkentett (üres szimbólumok) receptorszámú rendszerekben. Az x tengely az agonisták (szervkádbeli) moláris koncentrációjának logaritmusát mutatja, az y tengely pedig a kiváltott hatást. A folytonos vonalak jelzik az illesztett Hill egyenletet. Az A panelen a szimbólumok az átlag  $\pm$  SEM értéket mutatják. Ado: adenzin (az  $A_1$  adenzin receptor endogén, rövid féleletidejű agonistája); CPA:  $N^6$ -cyclopentyladenosine (szintetikus  $A_1$  adenzin receptor agonista hosszú felezési idővel); FSCPX: előzetes kezelés 8-cyclopentyl-3-[3-[[4-(fluorosulfonyl)benzoyl]oxy]propyl]-1-propylxanthine-nal (irreverzibilis  $A_1$  adenzin receptor antagonistája); A: A agonista (az adenzint szimulálja); B: B

agonista (a CPA-t szimulálja); IA: előzetes kezelés irreverzibilis antagonistával (FSCPX előkezelés szimulálása). Az A panel adatai korábbi kísérletekből származnak (Pák és mtsai, 2014).

#### 4.1.2. Az önmagában alkalmazott TI kezelés, valamint az IA-val és TI-vel való együttes kezelés hatása az A agonista E/c görbéjére

A TI (NBTI szimuláció) kezelés az A agonista E/c görbét balra tolta és kissé csökkentette a maximális hatást, csakúgy, mint ahogy azt a 10  $\mu\text{mol/L}$  NBTI kezelés tette az adozin E/c görbével. Mivel a szimuláció során több tényezőt kellett harmonizálni, ez a hatás valamivel kisebb volt a szimulált modellben, mint a biológiában. A 10  $\mu\text{mol/L}$  FSCPX és 10  $\mu\text{mol/L}$  NBTI együttes alkalmazásának meglepő hatása az adozin E/c görbére (vagyis az, hogy ENT1 blokádnál az irreverzibilis  $A_1$  receptor antagonisták fokozni látszott az adozin maximális hatását; 11. A ábra) azonban nem volt *in silico* reprodukálható azzal a feltételezéssel, hogy a TI az IA előkezeléstől függetlenül hat. Ezzel szemben, amikor interakciót feltételeztünk az IA és TI között, a három E/c görbe relatív helyzetét sikerült a biológiai rendszerben láthatóhoz hasonlóvá tenni (11. B ábra).



11. ábra: *Ex vivo* (A panel) és *in silico* (B panel) E/c görbék, melyek rövid féléletű agonista hatását mutatják transzport inhibitor hiányában és jelenlétében, intakt (kitöltött szimbólumok) és csökkentett receptorszámú (nyitott szimbólumok) rendszerekben. Az E/c görbék előállításához használt valós és szimulált agonista egyaránt nagymértékben eliminálódik jelentős membrán transzportjának köszönhetően. Az x tengely mutatja az agonisták (szervkádbeli) moláris koncentrációjának logaritmusát, az y tengely pedig a

kiváltott hatást. A folytonos vonalak jelzik az illesztett Hill egyenletet. Az A panelen a szimbólumok az átlag  $\pm$  SEM értéket mutatják. Ado: adenzin; NBTI: kezelés S-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine-nal (az ENT1 gátlója); FSCPX: előzetes kezelés 8-cyclopentyl-3-[3-[[4-(fluorosulfonyl)benzoyl]oxy]propyl]-1-propylxanthine-nal (irreverzibilis A<sub>1</sub> adenzin receptor antagonistája); A: A agonista (az adenzint szimulálja); TI: kezelés az A agonista transzport inhibitorával (az NBTI jelenlétének szimulálása); IA: előkezelés irreverzibilis receptor antagonistával (az FSCPX előkezelés szimulálása). Az A panel adatai korábbi kísérletekből származnak (Pák és mtsai, 2014).

Ezen vizsgálat során azt feltételeztük, hogy az előzetes IA előkezelés gátolja a TI hatását. Fontos szempont volt, hogy mindkét kezelt görbe a kontroll (egyszerű, torzítatlan) görbe fölött fusson, egészen a két legmagasabb koncentrációig, ahol mindkét kezelt görbe a kontroll görbe alá kell kerüljön (11. B ábra).

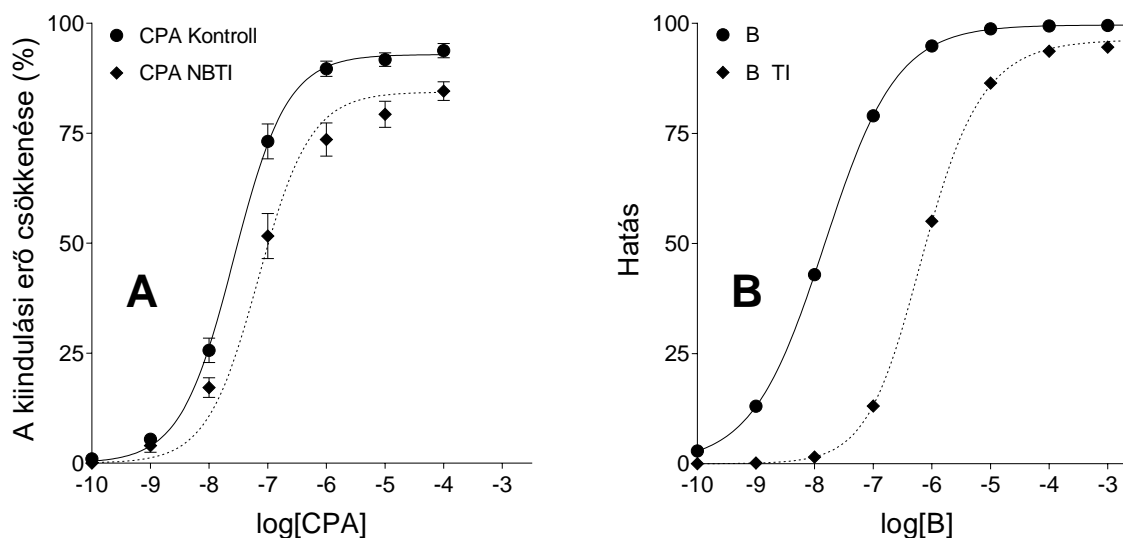
#### 4.1.3. A TI kezelés hatása a B agonista E/c görbéjére

A TI kezelés jobbra tolta a B agonista E/c görbéjét és mérsékelten csökkentette annak maximális hatását, összehasonlítva a B agonista egyszerű, torzítatlan és IA nélküli E/c görbéjével (amely a kontroll görbét képviseli). Ez megfelel az *ex vivo* CPA E/c görbék viselkedésének, melyeket 10  $\mu$ mol/L NBTI hiányában illetve jelenlétében vettünk fel. Noha a szimulált modell kissé eltérő választ adott a TI-re, mint a biológiai modell az NBTI-re, az E/c görbék relatív helyzete azonos volt az *in silico* és az *ex vivo* modellekben (12. ábra). Az RRM becslése a transzportgátlás miatti többlet A agonista koncentrációra egyébként majdnem megegyezett a szimulációban előre meghatározott értékkel ( $3.86 \cdot 10^{-7}$  és  $4 \cdot 10^{-7}$ ).

#### 4.1.4. Az A agonista korrigált E/c görbéi

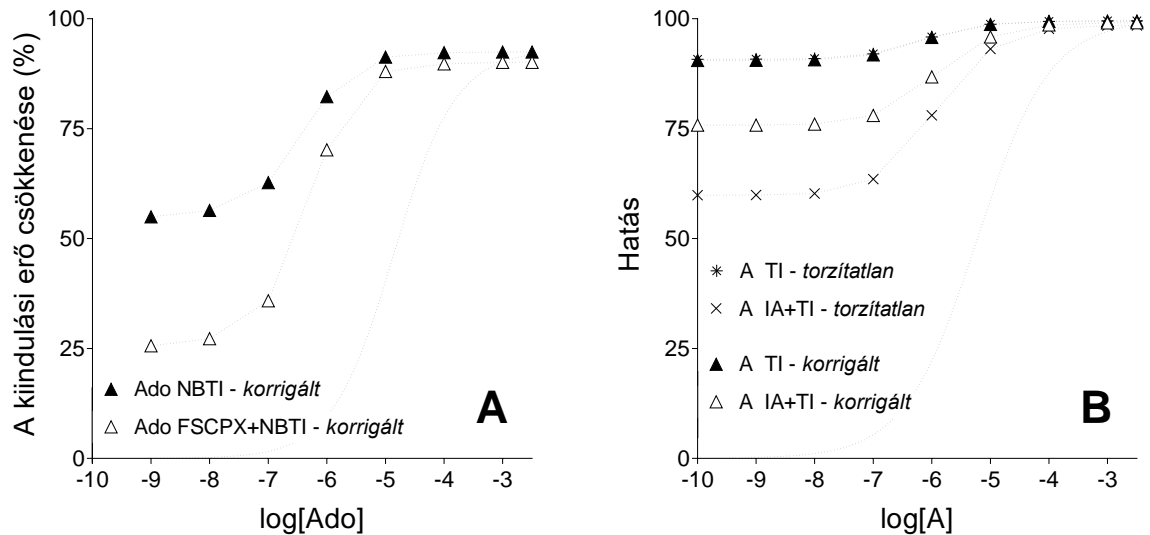
A transzportgátlás hatására fellépő agonista akkumuláció torzító hatásának korrekcióját követően az E/c görbék ugyanazt az elrendeződést mutatták az *in silico* és az *ex vivo* rendszerekben (13. ábra). Az A agonista telítő koncentrációinál a csak TI-vel kezelt E/c görbe hatás értékei meghaladták az IA-val és TI-vel egyaránt kezelt E/c görbe hatás értékeit, igaz, nem sokkal, a görbék hatás értékei szinte azonosak voltak (13. B ábra). Az IA kezelés hatása az A agonista maximális hatására tehát meglehetősen csekélynek bizonyult az *in silico* rendszerben (13. B ábra), hasonlóan az *ex vivo* rendszer esetében tapasztalhatóhoz (13. A

ábra). Ez az eredmény megerősíti azon korábbi vizsgálataink eredményeit, amelyek szerint az adenosin direkt negatív inotróp hatására vonatkozó  $A_1$  receptor rezerv igen nagy tengerimalac pitvarban (Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014).



12. ábra: *Ex vivo* (A panel) és *in silico* (B panel) E/c görbék, amelyek hosszú felezési idejű szintetikus agonista hatását mutatják agonista transzport inhibitor hiányában és jelenlétében, intakt receptor populációval rendelkező rendszerben. A transzportgátlás nem befolyásolta az E/c görbéknél alkalmazott szintetikus agonista sorsát, mindkét rendszerben csak az endogén agonista transzportját gátolták (amely ugyanazt a receptort aktiválja, mint a szintetikus agonista). Az x tengely mutatja az agonisták (szervkádbeli) moláris koncentrációjának logaritmusát, az y tengely pedig a kiváltott hatást. A folytonos vonalak az illesztett Hill egyenletet jelzik, míg a szaggatott vonalak az RRM (receptorális válaszkésztség módszer) illesztett egyenletét (13. egyenlet). Az A panelen a szimbólumok az átlag  $\pm$  SEM értéket adják meg. CPA:  $N^6$ -cyclopentyladenosine; NBTI: kezelés S-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine-nal (az ENT1 gátlója); B: B agonista (a CPA-t szimulálja); TI: kezelés az A (endogén) agonista transzport gátlójával, ami a B (szintetikus) agonistát nem befolyásolja (az NBTI jelenlétének szimulálása). Az A panel korábbi kísérletek adatait mutatja (Pák és mtsai, 2014).

Az A agonista korigált TI kezelt (és IA előkezelés nélküli) E/c görbéje a várakozásoknak megfelelően gyakorlatilag átfedte a neki megfelelő torzítatlan E/c görbével (amely a korrekció beépített kontrolljaként szolgált). Ezzel szemben a korigált IA előkezelt és TI kezelt E/c görbe jelentősen meghaladta a torzítatlan párját (a beépített kontrollt) az A agonista kis és közepes koncentrációinál. Mindazonáltal telítő A agonista koncentrációknál a két görbe különbsége elhanyagolhatóvá vált (13. B ábra).



13. ábra: *Ex vivo* (A panel) és *in silico* (B panel) E/c görbék, amelyek rövid felezési idejű agonista korrigált hatását mutatják transzport inhibitor hiányában és jelenlétében, továbbá intakt (kitöltött szimbólumok) és csökkentett (nyitott szimbólumok) receptorszámú rendszerekben. Az *in silico* rendszer beépített kontroll (torzítatlan) görbéinek szimbólumai: x és \*). Az x tengely az agonisták (szervkádbeli) moláris koncentrációjának logaritmusát mutatja, az y tengely pedig a kiváltott hatást. A szimbólumok közötti pontozott vonalak csak összekapcsolják őket, míg a szimbólumok nélküli pontozott vonalak a kontroll adenosin E/c görbe adataira (A panel) és az A agonista egyszerű, torzítatlan E/c görbéjére (B panel) illesztett Hill egyenletet mutatják intakt receptor populációjú rendszerekben. Ado: adenosin; NBTI: kezelés S-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine-nal; FSCPX: előzetes kezelés 8-cyclopentyl-3-[3-[[4-(fluorosulfonyl)benzoyl]oxy]propyl]-1-propylxanthine-nal; A: A agonista (az adenosint szimulálja); TI: kezelés az A agonista transzport inhibitorával (az NBTI jelenlétének szimulálása); IA: előzetes kezelés irreverzibilis antagonistával (az FSCPX előkezelés szimulálása); torzítatlan (unbiased): az A agonista torzítatlan E/c görbéi (a megfelelő korrigált E/c görbék beépített kontroll függvényei); korrigált (corrected): korrigált E/c görbék. Az A panel adatait korábbi kísérletekből vettük át (Pák és mtsai, 2014).

Ennek a jelenségnek az oka az IA és a TI hatásai között modellezett interferencia. Az adenosin E/c görbék relatív helyzetének reprodukálása érdekében feltételeztük, hogy az IA kezelés enyhén gátolja a TI egyébként teljes gátló hatását az A agonista transzportjára. Ugyanakkor a korábbi gyakorlatot követve (Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014) csak egy  $c_x$  értéket (ekvifektív B agonista koncentráció) használtunk a TI által előidézett A agonista többlet számszerűsítéséhez. Mivel ezt a  $c_x$ -et az IA előkezelés nélküli E/c görbékéből

nyertük, ez a komplett transzport blokádi alatti agonista felhalmozódásról tájékoztat. Ezért ezt a  $c_x$ -et nem lehet felhasználni az IA-val előkezelt E/c görbék korrekciójára, hiszen új hipotézisünk alapján (miszerint az IA és a TI között interakció van) IA és TI együttes alkalmazása inkompletté teszi a transzport blokádot.

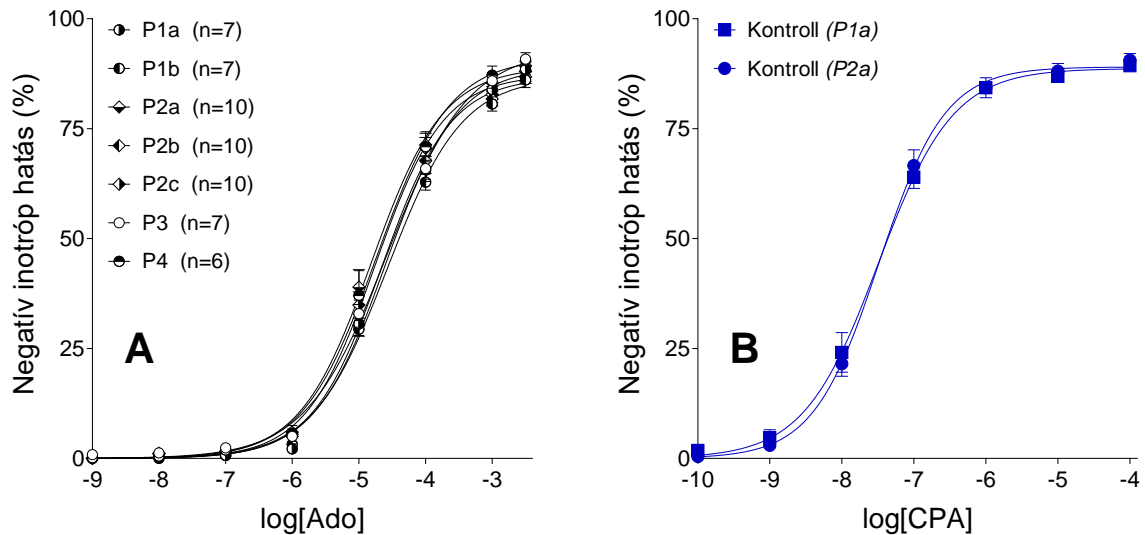
Mivel nem találtunk erre vonatkozó korábbi adatot és eddig számunkra sem merült fel az FSCPX és az NBTI közötti interakció lehetősége, korábbi munkáink során minden számításához egy  $c_x$  értéket alkalmaztunk (Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014). A jelen vizsgálat eredményeit figyelembe véve ez a gyakorlat elvi alapon kifogásolhatónak bizonyult. A korábban a receptor rezerv nagyságára vonatkozó, a korrigált E/c görbékből levont következtetések azonban helyesek maradtak, mivel az elvi hiba következményei gyakorlatilag nem érintik ezen görbék terminális (szaturált) szakaszát (melyek alapján az  $A_1$  receptor rezervre vonatkozó megállapítások leszűrhetőek) (13. B ábra).

## 4.2. A tengerimalac pitvaron végzett *ex vivo* kísérletek eredményei

### 4.2.1. A kezeletlen (kontroll) adenzin és CPA E/c görbék

Az exogén adenzin – a korábbi tapasztalatoknak megfelelően – koncentrációfüggően csökkentette az összes pitvar kontrakciós erejét. Az első adenzin E/c görbék Hill paraméterei nem mutattak szignifikáns különbségeket az egyes kísérleti csoportok között. Ez a megfigyelés a jelen vizsgálathoz használt pitvarok homogenitását mutatja (14. A ábra).

A pitvari kontrakciós erőt a CPA is koncentrációfüggő módon csökkentette, szintén összhangban a korábbi tapasztalatokkal. A P1a és a P2a csoportok CPA E/c görbéinek Hill paraméterei nem különböztek szignifikánsan egymástól (2. táblázat), jelezve, hogy a protokolljaik közötti különbségek (különös tekintettel az időtartamra, lásd: 1. táblázat) nem befolyásolták lényegesen a CPA-ra adott választ (14. B ábra).

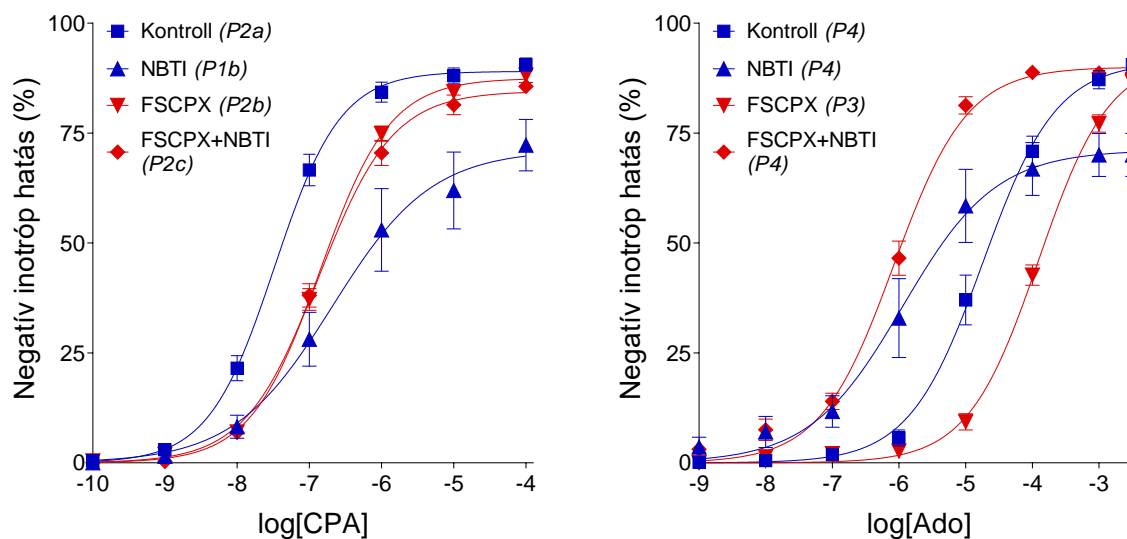


14. ábra: Az adenoszin (A panel) és a CPA (B panel) direkt negatív inotróp hatása izolált tengerimalac pitvaron az adenoszin homeosztázisát módosító vegyszerek (FSCPX, NBTI) hiányában. Az A panelen az adenoszinnal felvett első koncentráció-hatás (E/c) görbe látható mind a hét csoportban (P1a, P1b, P2a, P2b, P2c, P3 és P4). A B panelen a CPA-val felvett (második) E/c görbe került bemutatásra a P1a és a P2a csoportokban. A „kontroll” kifejezés ezen görbék szerepére utal, emellett jelzi kezeletlenségüket is. Az x tengely az agonisták (szervkádbeli) moláris koncentrációjának tízes alapú logaritmusát mutatja, míg az y tengely a hatást (a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenéseként). A szimbólumok az agonista koncentrációkra adott válaszok csoportátlagát jelzik ( $\pm$  SEM), a görbék pedig az illesztett Hill egyenletet szemléltetik. Fekete E/c görbe: első E/c görbe adenoszinnal; Kék E/c görbe: második E/c görbe FSCPX nélkül; Ado: adenoszin; CPA: N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine.

#### 4.2.2. A CPA E/c görbék a P1 és P2 csoportokban

Korábbi megfigyeléseinkkel (Karsai és mtsai, 2006, 2007; Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014) összhangban az NBTI kezelés a CPA E/c görbét jelentősen deprimálta (csökkentve az E<sub>max</sub>-ot) és jobbra tolta (növelve a logEC<sub>50</sub>-et) a kontroll CPA E/c görbével összehasonlítva. Korábbi megfigyeléseinkkel (Gesztelyi és mtsai, 2013; Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014) szintén összhangban az FSCPX előkezelés a CPA E/c görbét mérsékelten jobbra tolta a kontroll CPA E/c görbéhez képest (növelve a logEC<sub>50</sub>-et). Az FSCPX és az NBTI együttes alkalmazása ugyanakkor a CPA E/c görbe lefutásán a kizárólag FSCPX-szel előkezelt CPA E/c görbéhez képest csaknem semmit nem változtatott, eltekintve az E<sub>max</sub> és a Hill koefficiens enyhe, nem szignifikáns csökkentésétől. Ez azt jelenti, hogy az FSCPX

előkezelés szinte teljesen felfüggesztette az NBTI hatását a CPA-ra adott válasza (15. A ábra, 2. táblázat).

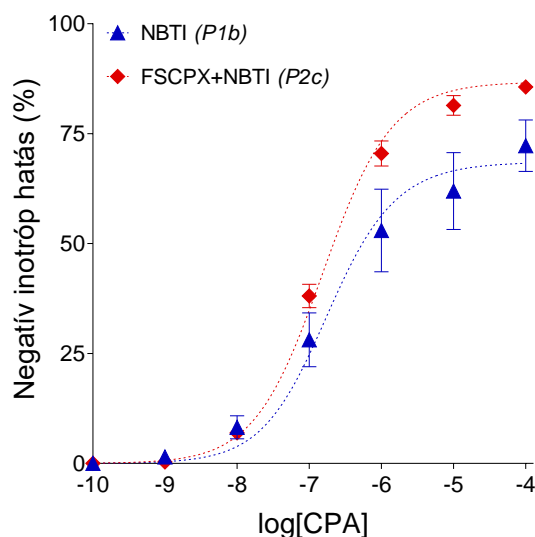


15. ábra: A CPA (A panel) és az adenozin (B panel) direkt negatív inotróp hatása FSCPX előkezeléssel és anélkül, kombinálva NBTI hiányával és jelenlétével. Az alkalmazott (elő)kezeléseket és a kísérleti csoportokat (*dőlttel szedve*) feltüntettük. Az egyszerűség kedvéért a P1a (kontroll) és a P3 kontroll görbét (amelyek nem különböztek jelentősen a P2a (kontroll) és a P4 kontroll görbétől) elhagytuk. Az x tengely az agonisták (szervkádbeli) moláris koncentrációjának tízes alapú logaritmusát mutatja, az y tengely pedig a hatást (a kiindulási kontrakció erő százalékos csökkenéseként). A szimbólumok az agonista koncentrációkra adott válaszok csoportátlagait ábrázolják ( $\pm$  SEM), a görbék pedig az illesztett Hill egyenletet szemléltetik. Kék E/c görbe: FSCPX nélkül; Piros E/c görbe: FSCPX előkezelés után; Ado: adenozin; CPA: N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine; NBTI: S-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine; FSCPX: 8-cyclopentyl-3-[3-[[4-(fluorosulfonyl)benzoyl]oxy]propyl]-1-propylxanthine.

Az NBTI (P1b) hatására felhalmozódott többlet interstitialis adenozin 100,2 nM CPA-val, míg az FSCPX és NBTI együttes kezelés (P2c) hatására felszaporodó többlet interstitialis adenozin csak 6,73 nM CPA-val bizonyult ekvivalensnek. Ezek az eredmények az RRM által szolgáltatott regressziós paraméterekből  $1/\log(c_x)$  származnak, amelyek értékei -6,99 és -8,17 (95%-os konfidencia intervallumaik: -7,18 és -6,84, illetve  $-\infty$  és -7,72), az említés sorrendjében (16. ábra). Így az FSCPX előkezelés az NBTI által felhalmozott extra interstitialis adenozin koncentrációját kevesebb, mint egytizedre csökkentette az izolált tengerimalac pitvarban.

<b>CPA</b>	<b>P1a (Co)</b>	<b>P2a (Co)</b>	<b>P2b (X)</b>	<b>P1b (NB)</b>	<b>P2c (X+NB)</b>
<b>E<sub>max</sub></b>	88.42 ± 0.84	89.21 ± 1.46	87.49 ± 1.75	71.68 ± 5.24 ###; ###	84.6 ± 1.64 **
<b>logEC<sub>50</sub></b>	-7.51 ± 0.09	-7.47 ± 0.074	-6.85 ± 0.05 ++	-6.53 ± 0.32 ###	-6.86 ± 0.06 §§
<b>n</b>	0.9 ± 0.06	0.98 ± 0.03	0.93 ± 0.04	0.84 ± 0.09	0.86 ± 0.02
<b>Ado</b>	<b>P3 Co</b>	<b>P4 Co</b>	<b>P3 X</b>	<b>P4 NB</b>	<b>P4 X+NB</b>
<b>E<sub>max</sub></b>	93 ± 0.85	91.04 ± 1	93.85 ± 1.78	71.23 ± 4.9 #####; ####	90.22 ± 1 ****
<b>logEC<sub>50</sub></b>	-4.58 ± 0.08	-4.74 ± 0.13	-3.88 ± 0.07 +++	-5.92 ± 0.25 #####; ####	-6.08 ± 0.07 §§§§; ◇◇◇◇
<b>n</b>	0.73 ± 0.03	0.85 ± 0.03	0.83 ± 0.07	0.81 ± 0.13	0.830.1

2. táblázat. Az adenzin és CPA E/c görbék Hill paramétereit. Az E<sub>max</sub>, logEC<sub>50</sub> és n (átlag ± SEM) az egyes E/c görbékre illesztett Hill egyenlet regressziós paramétereit. A következő összehasonlításokat végeztük el: P1a és P2a (CPA E/c görbék); P3 és P4 (az első adenzin E/c görbék); a P1 + P2 csoport összes CPA E/c görbéje; a P3 + P4 csoport összes adenzin E/c görbéje. Az összes szignifikáns különbséget feltüntetjük (+: Co vs. X; #: Co vs. NB; §: Co vs. X + NB; ≠: X vs. NB; ◇: X vs. X + NB; \*: NB vs. X + NB). Co: kontroll (naiv); X: FSCPX előkezelés; NB: NBTI kezelés; X + NB: FSCPX-NBTI együttes kezelés; P1a, P1b, P2a, P2b, P2c, P3 és P4: csoportazonosítók; Ado: adenzin; CPA: N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine; NBTI: S-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine-nal; FSCPX: oxy]propyl]-1-propylxanthine; a jelek száma a statisztikai szignifikancia szintjére utal: egy jel: p <0,05; két jel: p <0,01; három jel: p <0,001; négy jel: p <0,0001.



16. ábra. A CPA direkt negatív inotróp hatása NBTI jelenlétében FSCPX előkezeléssel és anélkül. Az alkalmazott (elő)kezeléseket és a kísérleti csoportokat (*dőlttel szedve*) feltüntettük. Az x tengely a CPA (szervkádbeli) moláris koncentrációjának tízes alapú logaritmusát mutatja, az y tengely pedig a hatást (a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenéseként). A szimbólumok az agonista koncentrációkra adott válaszok csoportátlagait ábrázolják ( $\pm$  SEM), míg a szaggatott görbék az illesztett RRM modellt (13. egyenlet). Kék E/c görbe: FSCPX nélkül; Piros E/c görbe: FSCPX előkezelés után; CPA: N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine; NBTI: S-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine; FSCPX: 8-cyclopentyl-3-[3-[[4-(fluorosulfonyl)benzoyl]oxy]propyl]-1-propylxanthine.

#### 4.2.3. Adenozin E/c görbék a P3 és P4 csoportokban

Ahogy az várható volt (Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014), az NBTI szignifikánsan deprimálta és balra tolta az adenozin E/c görbét a kontrollhoz képest (bár az  $E_{max}$  csökkenése nagyobb volt, mint korábban). A várakozásoknak megfelelően (Gesztelyi és mtsai, 2013; Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014) az FSCPX előkezelés pedig jobbra tolta az adenozin E/c görbét a kontrollhoz képest, nagyjából annyira, mint a CPA E/c görbe esetében. Az FSCPX-NBTI együttes kezelés ugyanakkor olyan adenozin E/c görbét hozott létre, melynek  $E_{max}$  értéke gyakorlatilag megegyezett a kontroll (valamint a kizárólag FSCPX előkezelt) adenozin E/c görbe  $E_{max}$ -ával,  $\log EC_{50}$  értéke viszont hasonló volt a kizárólag NBTI kezelt adenozin E/c görbe  $\log EC_{50}$ -ével. Az FSCPX előkezelés tehát gátolni látszik az NBTI néhány, de nem minden hatását az adenozinra adott válasza (15. B ábra, 2. táblázat).

#### *4.2.4. Az FSCPX előkezelés és az NBTI kezelés interferenciája*

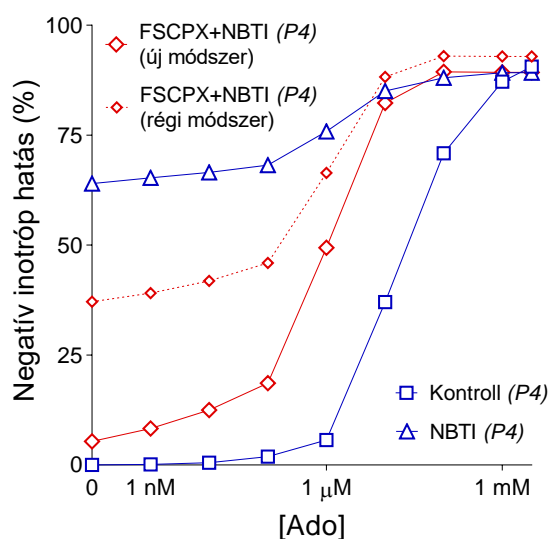
Korábban nagy meglepetést okozott munkacsoportunknak az a paradox jelenség, hogy NBTI jelenlétében az FSCPX előkezelés kismértékben (de egyértelműen) fokozni látszott az adozinra adott választ (Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014). A jelen vizsgálatban ezen interferencia mértéke szokatlanul nagy volt (csakúgy, ahogy az NBTI deprimáló hatása is igen kifejezett volt a korábbi tapasztalatokhoz képest). Az FSCPX előkezelés szignifikánsan növelte a CPA-ra és az adozinra adott választ is, nemcsak magas koncentrációkban, hanem közepes koncentrációkban is, amikor az FSCPX+NBTI kezelt E/c görbékét a kizárólag NBTI kezelt görbékkel hasonlítottuk össze (15. A, B ábra). Az FSCPX előkezelés ugyanakkor nem befolyásolta szignifikánsan az NBTI erőteljes balra toló hatását az adozin E/c görbére. Ennek eredményeként az FSCPX+NBTI kezelt és a csak FSCPX előkezelt CPA E/c görbe alig különülnek el, míg az FSCPX+NBTI kezelt és a csak FSCPX előkezelt adozin E/c görbe egymástól a lehető legtávolabb helyezkednek el (15. A, B ábra, 2. táblázat).

Egy másik megközelítés ennek az interferenciának a bemutatására, ha az NBTI kezelt E/c görbék és a nekik megfelelő kontroll E/c görbék közötti különbségeket hasonlítjuk össze az FSCPX+NBTI kezelt E/c görbék és a megfelelő csak FSCPX előkezelt E/c görbék közötti különbségekkel. Ily módon olyan pitvarokat hasonlítottunk össze, amelyeknek hasonló nagyságú a működőképes  $A_1$  receptor készlete. A CPA E/c görbékét illetően az NBTI önmagában kb. 16,7%-kal csökkentette az  $E_{max}$ -ot és az E/c görbe tízszeres jobbra tolódását eredményezte. Ezzel szemben FSCPX előkezelés után az NBTI csak 2,9% -kal csökkentette az  $E_{max}$ -ot és nem változtatta meg az E/c görbe helyzetét (tehát az  $EC_{50}$ -et, lásd: 2. táblázat). Az adozin E/c görbék esetében az NBTI önmagában 19,8%-kal csökkentette az  $E_{max}$ -ot és 15-szörös balra tolódást okozott. Az FSCPX előkezelés után azonban az NBTI 3,6%-kal csökkentette az  $E_{max}$ -ot (hasonlóan a CPA-val kapott eredményekhez), miközben hatalmas, mintegy 158-szoros eltolódást eredményezett balra (2. táblázat).

#### *4.2.5. Az NBTI jelenlétében felvett adozin E/c görbék korrigált hatásai*

A korrigált, csak NBTI kezelt adozin E/c görbe jelentősen meghaladta korrigálatlan (hagyományosan értékelt) párját. A korrigált, csak NBTI kezelt adozin E/c görbe maximuma elérte kontrolljának maximumát (a P4-csoport kezeletlen adozin E/c görbéjét). A korrigált, csak NBTI kezelt adozin E/c görbe kiindulási pontja az a hatás volt, amit az

NBTI miatt felszaporodó interstitialis adenzin önmagában váltott ki intakt A<sub>1</sub> receptor készleten (17. ábra).



17. ábra. Az adenzin koncentráció hatás (E/c) görbék régi és új módszerrel korrigált hatás értékei az NBTI jelenlétében felvett P4 csoportban, FSCPX előkezeléssel és anélkül. Viszonyítási alapként a P4 csoport kontroll adenzin E/c görbéje is feltüntetésre került (amelynek hatás értékei eleve torzulásmentesnek tekinthetők). Az alkalmazott (elő)kezeléseket és a kísérleti csoportot (*utóbbi dőlt betűvel*) is megneveztük. Az x tengely logaritmikus skálán az exogén adenzin szervkádbeli koncentrációit mutatja, az y tengely pedig a hatást (a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenéseként). A szimbólumok az adenzinra adott átlagolt válaszokat jelzik. Kék E/c görbe: FSCPX nélkül; Piros E/c görbe: FSCPX előkezelés után; Ado: adenzin; FSCPX: 8-cyclopentyl-3-[3-[[4-(fluorosulfonyl)benzoyl]oxy]propyl]-1-propylxanthine; NBTI: S-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine.

A P4 csoport átlagolt, FSCPX+NBTI kezelt adenzin E/c görbéjét kétféleképpen korrigáltuk: az új módszerrel (amelyet az előbbieken bemutatott *in silico* vizsgálat során kapott eredmények alapján javítottunk), valamint a régi módszerrel (Kiss és mtsai, 2013).

Az új módszer alkalmazásakor a korrigált FSCPX+NBTI kezelt adenzin E/c görbe mélyen a korrigált, csak NBTI kezelt adenzin E/c görbe alatt kezdődött, de gyakorlatilag ugyanazt a maximumot érte el, mint a kontroll görbe és a korrigált, csak NBTI kezelt adenzin E/c görbe. Korábbi megállapításunknak (Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014) megfelelően ez is azt mutatja, hogy az A<sub>1</sub> receptor rezerv igen nagy az adenzin direkt negatív inotróp hatására nézve tengerimalac pitvaron. A korrigált FSCPX+NBTI kezelt

adenozin E/c görbe kiindulási pontját a FSCPX+NBTI kezelés okozta többlet interstitialis adenzin depletált A<sub>1</sub> receptor készleten kiváltott hatása képezte (17. ábra).

A régi módszerrel korrigált FSCPX+NBTI kezelt adenzin E/c görbe látványosan meghaladta az új módszerrel korrigált megfelelőjét alacsony és közepes (exogén) adenzin koncentrációk mellett. Magas (exogén) adenzin koncentrációk mellett a régi módon korrigált görbe már közel került új megfelelőjéhez (17. ábra). Ez azt mutatja, hogy a régi módszerrel kapott eredmények túlbecsülik a kérdéses receptor rezervet, de csak kis mértékben.

Meg kell jegyezni, hogy mivel az endogén (és ezáltal az összegzett) interstitialis adenzin koncentráció pontos értékei az A<sub>1</sub> receptorok közelében a vizsgálat során ismeretlenek maradtak, a korrigált hatás értékeket csak a könnyen kiszámítható szervkádbeli exogén adenzin koncentráció függvényében lehetett ábrázolni. Mindazonáltal a P4 csoporton belül az eredendően torzulásmentes (vagyis NBTI nélkül felvett) hatás értékek és a korrigált értékek (különösen azok, amelyek magas exogén adenzin koncentrációkhoz tartoznak) jól (informatív módon) összehasonlíthatók egymással (17. ábra).

## 5. Megbeszélés

### 5.1. Az *in silico* következtetések

Az *in silico* vizsgálatunk bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy az általunk kidolgozott kvalitatív módszerrel megbízhatóan lehet értékelni az adenzin – mint gyorsan metabolizálódó endogén agonista – által kiváltott direkt negatív inotróp hatásra vonatkozó A<sub>1</sub> adenzin receptor rezervet izolált és ingerelt tengerimalac bal pitvaron. Ugyanakkor a szimulációs vizsgálatunk során azt is megállapítottuk, hogy az FSCPX előkezelés feltehetően gyengíti az NBTI hatását az A<sub>1</sub> adenzin receptor stimuláció hatását tükröző E/c görbékre. További eredményünk, hogy az FSCPX előkezelést követő NBTI kezelés mellett felvett adenzin E/c görbe a közelmúltban publikált módszerünkkel (Kiss és mtsai, 2013) végzett korrekció után enyhén túlbecsüli a receptor rezervet. (Ennek kiküszöbölésére egyébként a később ismertető *ex vivo* vizsgálatunk során egy új, javított módszert ajánlottunk, ami mentes ettől a hibától.)

Az alapkutató, valamint a gyógyszerfejlesztés szempontjából alapvető fontosságú, hogy feltárjuk a pontos E/c összefüggéseket minden ígéretes receptor agonista esetében, ideértve a rövid felezési idejű vegyületeket is. Fontos az is, hogy felmérjük ezen ágensek hatás kiváltó képességét a különböző szövetekben a különböző receptorok által közvetített változatos hatások szempontjából. Ugyanakkor komoly kihívást jelent a gyorsan eliminálódó ágensek vizsgálata, mivel ezek koncentrációja erősen függ számos belső mechanizmustól, így fokozottan érzékeny a különféle külső beavatkozásokra. Ezenkívül különösen nehéz a rövid felezési idejű agonisták – mint például az adenzin – szintjét kvantifikálni a receptoraik mikro környezetében, ami az E/c görbe szempontjából releváns szöveti kompartment (Karsai és mtsai, 2006; Ramakers és mtsai, 2008). Ezek a nehézségek többek között akadályozzák az adenzin és a hasonlóan gyorsan bomló agonisták receptor rezervjének meghatározását is (Gesztelyi és mtsai, 2013).

*In silico* modellünket azért fejlesztettük ki, hogy szimulálni tudjuk a pitvari myocardium adenzinerg és adenzin kezelő mechanizmusait annak érdekében, hogy az A<sub>1</sub> adenzin receptor által mediált direkt negatív inotróp hatásra vonatkozó receptor rezerv nagyságát fel tudjuk mérni. Munkánk során reprodukáltuk azokat az adenzin és CPA E/c görbéket, amelyeket a munkacsoport előző *ex vivo* tanulmányában mutatott be (Pák és mtsai, 2014). A szimulált görbéket az *ex vivo* E/c görbéknél ismertető módon (Kiss és mtsai, 2013) értékeltük és összehasonlítottuk a biológiai rendszer megfelelő görbéivel kísérleti

módszerünk validálása és eredményeink lehető legjobb értelmezése érdekében.

A különböző adenzin analógokkal (FSCPX, NBTI) kezelt adenzin és CPA E/c görbék könnyen reprodukálhatónak bizonyultak. Ahhoz azonban, hogy az FSCPX-szel és NBTI-vel egyaránt kezelt E/c görbék lefutását reprodukálni tudjuk (11. ábra), feltételeznünk kellett, hogy a szimulált FSCPX előkezelés valamilyen módon gyengíti a szimulált NBTI kezelés hatását az E/c görbékre. Ahol e két vegyület (pontosabban a velük végzett kezelés) nem fordult elő ugyanabban a rendszerben, a szimulált E/c görbék „valóságú” viselkedéséhez elegendő volt jól ismert hatásaikat feltételezni (11. ábra).

Az a zavarba ejtő kérdés, hogy milyen mechanizmus okozhatja az FSCPX és az NBTI hatásainak interferenciáját, megválaszolatlan maradt a jelen disszertációt megalapozó 2017-es *in silico* vizsgálat során. Egy egyszerű lehetőséget már akkor is felvetettünk, nevezetesen azt, hogy az FSCPX – esetlegesen az ENT1 kovalens módosítása révén – úgy változtatja meg az ENT1 szerkezetét, hogy akadályozza az NBTI-t az ENT1 gátlásában (tehát az FSCPX irreverzibilis antagonistaként viselkedne az ENT1 NBTI-kötőhelyén is). Felmerültek egyéb lehetőségek is, például az FSCPX aktiválhatná az ENT1-en kívüli nukleozid transzportereket (pl. ENT2), mely hatás nem lenne észlelhető, ha a domináns ENT1 működne, de az NBTI okozta ENT1 blokádnak már észrevehetővé tenné ezt a transzportot. A kérdés megválaszolásához a jelen disszertációt megalapozó *ex vivo* vizsgálat vitt kicsivel közelebb.

A jelen *in silico* vizsgálat tapasztalatai megerősítették azon korábbi *ex vivo* eredményünket, hogy az A<sub>1</sub> adenzin receptor rezerv igen jelentős az adenzin tengerimalac bal pitvari A<sub>1</sub> receptorok mediálta direkt negatív inotróp hatására nézve (Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014). Ennek jelentőségét aláhúzza az adenzin rövid féléletideje, ami megnehezítette a receptor rezerv meghatározást a korábbi módszerekkel (Gesztelyi és mtsai, 2013). Emellett vizsgálatunk felhívja a figyelmet a kísérletek során használt vegyi anyagok között lehetséges váratlan kölcsönhatásokra is, amelyeket sosem szabad teljesen kizárni az eredmények interpretálása során (hacsak nem történtek idevágó ellenőrző vizsgálatok is, melyek ezt megengedik).

Korábban bemutatott kvalitatív módszerünk (Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014) hozzájárulhat receptor rezervre vonatkozó hasznos adatok gyűjtéséhez más rövid felezési idejű agonisták esetében is. Ezen új módszer gyakorlatba történő bevezetésének lehetséges előnyei a receptor rezerv jelentőségéből és sajátos természetéből adódnak. A különböző agonisták hatékonysága kiszámíthatóvá válhat a különböző szövetekben a hozzájuk tartozó receptor rezerv értékek alapján: ez egy olyan tudás, amely, ha a gyógyszerfejlesztésben alkalmazzák, segíthet csökkenteni a nem kívánt mellékhatásokat. Számos terápiás

indikációban fejlesztenek olyan a kis hatékonyságú  $A_1$  receptor agonistákat, amelyek csak a nagy  $A_1$  receptor rezervvel rendelkező szövetekben váltanak ki számottevő hatásokat (Albrecht-Küpper és mtsai, 2012; Greene és mtsai, 2016; Kiesman és mtsai, 2009; Schenone és mtsai, 2010; Szentmiklósi és mtsai, 2011a). Mivel egyes hatóanyagok ugyanakkor endogén agonisták szintjét és/vagy eloszlását befolyásolják, az ezekkel az agonistákkal kapcsolatos receptor rezerv adatoknak is van terápiás jelentősége. Ezen megfontolásokon túl módszerünk az alap kutatásban is felhasználható, nevezetesen az endogén agonisták E/c kapcsolatának feltárására különböző körülmények között. Erre példaként szolgáljon munkacsoportunk egy korábbi vizsgálata, ahol az új módszer részeként alkalmazott korrekciós eljárás eredményei alapján új megállapítást tettünk a pajzsmirigyhormon-érzékeny adenzin dezamináz gátlás hatásáról. A vizsgálat során az adenzin dezamináz gátlása fokozta a pitvari  $A_1$  adenzinerg jele erősítést, ami hyperthyreosisban kifejezettebb volt (Pák és mtsai, 2015). Ez a mechanizmus gyakorlati jelentőséggel bírhat a szív ischaemiás toleranciájának javításában.

Receptor rezerv meghatározó módszerünk fő hiányossága kvalitatív (legjobb esetben is szemikvantitatív) jellege. Mindazonáltal egy elméleti (és bizonyos esetekben gyakorlati) korlátokkal rendelkező kvantitatív modell helyett egy ilyen hátrányoktól mentes kvalitatív modell használata hasznos kompromisszum lehet. A hagyományos receptorelméletet és az arra épülő, receptor rezerv meghatározásra alkalmas módszereket ugyanis az utóbbi időben többen kritizálták az agonista-receptor kölcsönhatás túlzott egyszerűsítése miatt. Ez az egyszerűsítés akadályozná a valós  $K_A$  értékek kiszámítását, amelyekre szükség van a pontos receptor rezerv értékek kiszámításához, különösen a meglehetősen komplex G-protein kapcsolt receptorok esetében (Leff, 1995; Colquhoun, 1998; Bindsley, 2008; Stott és mtsai, 2016). Ez a kritika érinti az operatív modellt (Black és Leff, 1983) és Furchgott módszerét (Morey és mtsai, 1998) is, mely eljárások gyakran használatosak  $K_A$  értékek meghatározásához ezáltal a receptor rezerv kvantifikálásához (Gesztelyi és mtsai, 2013). A mi módszerünk azonban nem támaszkodik a hagyományos receptorelmélet feltételezéseire, csak a Hill egyenlet (mint receptorfunkció modell; Gesztelyi és mtsai, 2012) meglehetősen általános feltételezésein és követelményein alapul, kiegészítve néhány, az RRM-re specifikus megkötéssel (Gesztelyi és mtsai, 2004). Módszerünk a receptor rezerv fogalmának alapját képező jelenségből indul ki, vagyis abból, hogy az irreverzibilis antagonistával végzett kezelés (tehát a működőképes receptorok számának csökkentése) nem feltétlenül vezet az agonista által kiváltható maximális hatás csökkenéséhez (Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014).

Mindent összevetve úgy látjuk, hogy elengedhetetlen a receptor rezerv fogalmának a poszttradicionális receptorelmélet korszakához való igazítása, ideértve a receptor rezerv definíciójának kiterjesztését receptorról receptor-rendszerre (ami egy a receptort és a hozzá tartozó posztrepció jelátviteli útvonalakat is magába foglaló, szövetfüggő funkcionális egység). A receptor rezerv gyakorlatias meghatározásának translációs következményei lehetnek, amelyek felhasználhatóak a racionális gyógyszerfejlesztésben.

## 5.2. Az *ex vivo* következtetések

A jelen értekezést megalapozó *ex vivo* vizsgálatunk fő megállapítása, hogy az FSCPX (irreverzibilis A<sub>1</sub> receptor antagonist) előkezelés szelektíven befolyásolja az NBTI (ENT1 inhibitor) egyes hatásait az adenzin és a CPA (A<sub>1</sub> receptor agonisták) E/c görbéire izolált, ingerelt tengerimalac bal pitvaron. Míg az FSCPX előkezelés erőteljesen gátolja az NBTI depresszív (E<sub>max</sub> csökkentő) hatását mind az adenzin, mind a CPA esetében, nem érinti lényegesen az NBTI hatását az adenzin E/c görbe EC<sub>50</sub> értékére. Ennek megfelelően az ezt megelőző *in silico* vizsgálat azon megállapítását, miszerint az FSCPX előkezelés úgy általánosságban gátolja az NBTI hatását, az új *ex vivo* eredmények fényében finomítani kell. Úgy tűnik, hogy az FSCPX előkezelés mérsékli az NBTI hatását az endogén adenzin interstitialis szintjére, de nem befolyásolja az NBTI hatását az exogén adenzin interstitialis koncentrációjára. Az FSCPX célpontja tehát (az A<sub>1</sub> receptor mellett) nem lehet az ENT1 transzporter vagy bármely más olyan molekula, amely részt vesz az NBTI exogén adenzin szintre gyakorolt hatásának közvetítésében. A kérdéses extra célpont inkább egy (vagy néhány) olyan molekula lehet, amely kizárólag az NBTI endogén adenzin koncentrációra kifejtett hatásával van kapcsolatban. Ilyen(ek) lehet(nek) az interstitialis adenzin termelésében részt vevő enzim(ek).

A receptor rezervet becselő módszerünk *in silico* vizsgálatában azt találtuk, hogy az e módszerrel kapott E/c görbéket (Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014) nem lehetett valóságúra szimulálni anélkül, hogy ne feltételeznénk az FSCPX és az NBTI hatásai között interferenciát. Az *in silico* vizsgálatunk során feltételeztük, hogy az FSCPX módosíthatja az ENT1-et oly módon, hogy lehetővé teszi az ENT1 számára az adenzin szállítását, de akadályozza az NBTI-t ezen transzport gátlásában. Az FSCPX és NBTI interferenciájának gyanújára való tekintettel *ex vivo* vizsgálatunkban módosítottuk receptor rezerv becselő módszerünket, hogy az FSCPX és az NBTI együttes hatását pontosabban tárhassuk fel.

Az FSCPX és az NBTI hatása az  $A_1$  receptor agonisták E/c görbéire három komponensre osztható: az endogén adenzin interstitialis szintjének befolyásolásával közvetített hatások (amelyeket korábban kizárólag az NBTI-nek tulajdonítottak: Karsai és mtsai, 2006, 2007), az exogén adenzin interstitialis szintjének befolyásolása révén mediált hatások (amelyet szintén az NBTI számlájára írtak: Gesztelyi és mtsai, 2003a), továbbá azok a hatások, melyek az  $A_1$  receptor populáció egy részének tartós inaktivációjából származnak (melyeket pedig az FSCPX-nek tulajdonítottak: Srinivas és mtsai, 1997).

Az endogén és exogén adenzin hatásainak megkülönböztetése kísérleti modellünk sajátosságaiból fakad. Az „endogén adenzin interstitialis szintjének befolyásolásával közvetített hatások” abból fakadnak, hogy az interstitialis adenzin koncentráció az adenzin receptor agonista E/c görbéjének felvétele előtt emelkedik meg. Ez fordul elő akkor, amikor az NBTI, amelyet az E/c görbe felvétele előtt a pitvar szervkádjába mérünk, csökkenti az interstitialisan előállított endogén adenzin eliminálását az adenzin transzport gátlásán keresztül. Ezzel szemben az „exogén adenzin interstitialis szintjének befolyásolásával mediált hatások” az E/c görbe felvétele során jelentkeznek. Ez az eset áll fenn, amikor az NBTI csökkenti az E/c görbe felvételére használt exogén adenzin eliminációját. A lényeg az, hogy ha a receptorok (és a jelátviteli útvonalaik) egy stimulusra reagálnak egy E/c görbe felvétele előtt, akkor a későbbi E/c görbén tükröződik a receptorok (és jelátviteli útjaik) válaszadási kapacitásának csökkentet. Ez egyébként az RRM alap gondolata (Gesztelyi és mtsai, 2004; Greczer és mtsai, 2010a, 2010b), ezért is volt kézenfekvő az RRM alkalmazása az E/c görbe felvétele előtt kialakult hatások okozta E/c görbe torzulások korrekciójára (Kiss és mtsai, 2013). Megállapíthatjuk, hogy az endogén és az exogén adenzin interstitialis koncentrációjának növekedése (pontosabban az E/c görbe felvétele előtti és alatti agonista koncentráció növekedés) ellentétes hatást gyakorol az E/c görbe fő paramétereire ( $E_{max}$ ,  $EC_{50}$ ) (3. táblázat).

Az NBTI kezelt CPA E/c görbe esetében a helyzet viszonylag egyszerű: az NBTI okozta endogén adenzin többlet elhasználja a sejt felszíni  $A_1$  receptorok (és posztreceptorális útvonalaik) válaszkészségének egy részét az E/c görbe felvétele előtt, ezért az NBTI csökkenti a CPA E/c görbe  $E_{max}$ -át és növeli az  $EC_{50}$  értékét (Karsai és mtsai, 2006). Az NBTI kezelt adenzin E/c görbe esetében a helyzet bonyolultabb: az emelkedett endogén adenzin szint következményei kombinálódnak az E/c görbe felvételekor beadott (exogén) adenzin csökkent eliminációjának következményeivel (mely utóbbiak önmagukban növelnék az E/c görbe  $E_{max}$ -át és csökkentenék az  $EC_{50}$ -ét). Eredő hatásként az NBTI csökkenti az adenzin E/c görbe  $E_{max}$ -át és  $EC_{50}$ -ét is (Gesztelyi és mtsai, 2003a) (3. táblázat).

	FSCPX	NBTI	FSCPX + NBTI	
1	endogén Ado szintre kifejtett hatása	<i>interstitialis Ado szint ↓</i> ( <i>interstitialis Ado termelés ↓</i> ): nem szignifikáns $E_{max} ↑ *$ nem szignifikáns $EC_{50} ↓ *$	<b>interstitialis Ado szint ↑</b> (befelé irányuló Ado transzport ↓): közepesen erős $E_{max} ↓$ közepesen erős $EC_{50} ↑$	<b>kisfokú interstitialis Ado szint ↑</b> ( <i>interstitialis Ado termelés ↓</i> és a befelé irányuló Ado transzport ↓): enyhe $E_{max} ↓$ enyhe $EC_{50} ↑$
2	exogén Ado szintre kifejtett hatása	–	interstitialis Ado szint ↑ (befelé irányuló Ado transzport ↓): enyhe $E_{max} ↑$ nagyon erős $EC_{50} ↓$	interstitialis Ado szint ↑ (befelé irányuló Ado transzport ↓): enyhe $E_{max} ↑$ nagyon erős $EC_{50} ↓$
3	egyéb adozinerg hatás	működő $A_1$ receptorok ↓: nem szignifikáns $E_{max} ↓ **$ közepes $EC_{50} ↑$	–	működő $A_1$ receptorok ↓: nem szignifikáns $E_{max} ↓ **$ közepes $EC_{50} ↑$
1 + 3	CPA E/c görbékre kifejtett hatás	<b>közepes <math>EC_{50} ↑</math></b>	<b>közepesen erős <math>E_{max} ↓</math></b> <b>közepesen erős <math>EC_{50} ↑</math></b>	<b>enyhe <math>E_{max} ↓</math></b> <b>közepes <math>EC_{50} ↑</math></b>
1 + 2 + 3	Ado E/c görbékre kifejtett hatás	<b>közepes <math>EC_{50} ↑</math></b>	<b>enyhén erős <math>E_{max} ↓</math></b> <b>erős <math>EC_{50} ↓</math></b>	<b>erős <math>EC_{50} ↓</math></b>

3. táblázat: Az FSCPX és az NBTI hatása a pitvari kontraktilitás adozinerg szabályozását tükröző CPA és adozin koncentráció-hatás (E/c) görbék fő empirikus paramétereire. A CPA és az adozin E/c görbékét a két fő Hill paraméterrel ( $E_{max}$  és  $EC_{50}$ ) jellemeztük, ezek változásait a kezeletlen (natív) állapothoz viszonyítottuk. Megjegyzendő, hogy az endogén adozin (interstitialis szintjének) növekedése ellentétes hatást gyakorol az adozin E/c görbe paramétereire, mint az exogén adozin (interstitialis szintjének) növekedése (a mi kísérleti körülményeink között). Számok a táblázat első oszlopában: különböző hatások és azok kombinációi; **félkövér**: munkacsoportunk jelenlegi és korábbi eredményei; **félkövér és dőlt betű**: a jelen *ex vivo* vizsgálat új eredményei; **dőlt**: új feltevések a jelen *ex vivo* vizsgálatban; egyszerű formázás: mások megalapozott eredményei, valamint a mások és munkacsoportunk eredményeiből levonható mértéktartó következtetések; ↑: növekedés; ↓: csökkenés; Ado: adozin; CPA:  $N^6$ -cyclopentyladenosine; NBTI: S-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine; FSCPX: 8-cyclopentyl-3-[3-[[4-(fluorosulfonyl)benzoyl]oxy]propyl]-1-propylxanthine. \*: ennek a hatásnak a mértéke attól függ, hogy milyen magas az endogén adozin interstitialis szintje (mivel a nyugalmi szint tengerimalac pitvarban túl alacsony ahhoz, hogy jelentős inotróp hatást váltson ki (Pák és mtsai, 2015), annak csökkentése nem jár észrevehető következményekkel); \*\*: a full agonista által kiváltott direkt negatív inotróp hatásra vonatkozó nagy  $A_1$  adozin receptor rezerv miatt (Gesztelyi és mtsai, 2013; Kiss és mtsai, 2013).

A jelen értekezést megalapozó vizsgálataink eredményeinek megjelenése előtt az FSCPX hatása egyszerűnek tűnt: a CPA és az adenzin E/c görbék  $EC_{50}$  értékének hasonló mértékű növekedését okozta, ami könnyen összefüggésbe hozható az FSCPX irreverzibilis  $A_1$  receptor antagonistá tulajdonságával és a nagy  $A_1$  receptor rezervvel a direkt negatív inotrópia tekintetében tengerimalac pitvaron (Gesztelyi és mtsai, 2013; Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014). Az *ex vivo* vizsgálatban azonban az FSCPX előkezelés és NBTI kezelés együttes alkalmazása az NBTI hatásainak szinte teljes eltűnését eredményezte a CPA E/c görbén, miközben az FSCPX hatása megmaradt (15. A ábra, 2. táblázat). Ez a görbe konstelláció nem magyarázható az FSCPX irreverzibilis  $A_1$  receptor antagonistá tulajdonságával. Ha az FSCPX csak egyszerű irreverzibilis  $A_1$  antagonistá lenne, akkor az NBTI kezelt CPA E/c görbéhez képest az FSCPX+NBTI kezelt CPA E/c görbe csak jobbra lenne tolódva (nagyobb  $EC_{50}$  értéke lenne, míg a szimpla NBTI kezelésre jellemző csökkent  $E_{max}$  megmaradt volna). Amikor pedig az FSCPX+NBTI kezelést az adenzin E/c görbe felvétele előtt alkalmaztuk, az NBTI  $E_{max}$  csökkentő hatása megszűnt (hasonlóan a CPA-val szerzett tapasztalatokhoz), az NBTI  $EC_{50}$  csökkentő hatása azonban gyakorlatilag változatlan maradt (15. B ábra, 2. táblázat). Az adenzinnal felvett E/c görbék egymáshoz viszonyított helyzete is ellentmond annak, hogy az FSCPX csak mint irreverzibilis  $A_1$  receptor antagonistá fejtené ki hatását, emellett azt is megmutatja, hogy az FSCPX nem gátolja az NBTI minden hatását.

Az *in silico* eredmények alapján felvetettük, hogy az FSCPX esetleg csökkenti az NBTI gátló hatását az ENT1-re. Ismert, hogy az NBTI minden hatása az ENT1 gátlásából származik (Thorn és mtsai, 1996): az ENT1 gátlás csökkenti a fiziológiásan befelé irányuló transzmembrán adenzin transzportot és növeli a bármilyen eredetű adenzin interstitialis koncentrációját (Deussen és mtsai, 1999, 2006). Az *in silico* vizsgálat során felállított hipotézis összhangban áll a CPA E/c görbék *ex vivo* viselkedésével (15. A ábra, 2. táblázat), de ellentétes az adenzin E/c görbék *ex vivo* megjelenésével (15. B ábra, 2. táblázat). Nehezen elképzelhető, hogy az FSCPX+NBTI kezelt adenzin E/c görbe  $EC_{50}$  értéke ugyanakkora maradna, mint a csak NBTI kezelt adenzin E/c görbéé úgy, hogy az NBTI összes hatása gátlás alá kerülne. Érdekes, hogy korábbi vizsgálataink (Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014) olyan eredményeket hoztak, amelyekre ez a korábbi hipotézis elképzelhető volt. Ehhez hozzájárult, hogy a csak NBTI kezelt adenzin E/c görbék depressziója ezekben a vizsgálatokban jóval kisebb volt, mint a jelen vizsgálatban (vagyis kisebb volt az NBTI hatása az endogén adenzin szintre).

Mindent egybevetve, az FSCPX ( $A_1$  receptoron kívüli) célpontjának egy olyan

molekulának kell lennie, amely az NBTI endogén adenzin szintet növelő hatásával áll kapcsolatban. Azok az enzimek az elsődleges jelöltek, amelyek részt vesznek az interstitialis adenzin képződésében. Reálisan feltételezhető, hogy az FSCPX, amely kapcsolódni tud az adenzin kötőhelyéhez az A<sub>1</sub> receptoron, ugyanezt meg tudja tenni egy (vagy több) enzim adenzin kötőhelyén is. Ha valóban ez a helyzet, az FSCPX előkezelés tartósan csökkenti az interstitialis adenzin szintet. Mivel a nyugalmi interstitialis adenzin koncentráció észrevehetőenül kis negatív inotróp hatást vált csak ki tengerimalac pitvarban (Pák és mtsai, 2015), annak FSCPX okozta csökkenése önmagában szintén nem észrevehető (a negatív inotrópia vizsgálatával). Ha azonban FSCPX előkezelés eredményeként kisebb az interstitialis adenzin-termelő képesség, az NBTI lényegesen kevésbé képes megemlíni az endogén adenzin interstitialis szintjét, mint ép interstitialis adenzin termelés mellett. Az interstitialis adenzin szint kisebb növekedése (az E/c görbe felvétele előtt) látványos változásokat idézhet elő mind az adenzin, mind a CPA E/c görbéin (az E<sub>max</sub> kevésbé csökken, az EC<sub>50</sub> pedig kevésbé nő) (3. táblázat).

Ha feltételezzük az FSCPX irreverzibilis enzimgátló hatását, akkor emellett az NBTI exogén adenzinra kifejtett védő hatása szabadon érvényesül, míg az endogén adenzinra kifejtett védő hatása gyengül. Mivel a mi kísérleti elrendezésünkben e két hatás egymás ellen dolgozik az adenzin E/c görbéjének módosítása során, az FSCPX előkezelés még ki is emeli az NBTI exogén adenzin spóroló hatásának következményeit (15. B ábra, 2. táblázat).

Elméletileg az interstitialis adenzin szint csökkentésének alternatív mechanizmusa is elképzelhető az FSCPX esetében: az interstitialis adenzin eliminációjának fokozása. Ez a mechanizmus azonban nem valószínű, mert csökkentené mind az exogén, mind az endogén adenzin koncentrációját, amit *ex vivo* eredményeink nem támogatnak.

A jelenség, amellyel szintén érdemes foglalkozni, a kis CPA koncentrációkra adott válasz enyhe növekedése az FSCPX+NBTI kezelt CPA E/c görbe esetén, összehasonlítva az FSCPX előkezelt CPA E/c görbével (15. A ábra). Ez úgy magyarázható, ha – korábbi megfigyelésünkkel összhangban (Gesztelyi és mtsai, 2004) – feltételezzük a CPA kismértékű eliminációját a pitvarszövetben. Ezt támasztja alá az NBTI kezelt és az FSCPX+NBTI kezelt adenzin E/c görbék összehasonlítása a kontroll és az FSCPX előkezelt görbékkel (15. B ábra), ahol is az NBTI védő hatása az adott adenzin receptor agonista alacsony koncentrációnál fokozott választ eredményezett (15. A B ábra). A témában folytatott további vizsgálatok során ezért fontolóra kell venni N<sub>6</sub>-cyclohexyladenosine (CHA) alkalmazását, ami a CPA-hoz hasonló szelektív A<sub>1</sub> receptor agonista, de ellenállóbb az adenzint elimináló enzimekkel szemben (Pavan és IJerman, 1998).

*Ex vivo* vizsgálatunk további megfigyelése, hogy az E/c görbe adatainak szórása a NBTI kezelt görbékénél a legnagyobb. Érdekes, hogy ezt az NBTI okozta nagy szórást jelentősen csökkentette az FSCPX előkezelés (15. A, B ábra, 16. ábra). Elképzelhető, hogy NBTI jelenlétében a nagy szórás oka az interstitialis adenzin termelésben résztvevő enzimek aktivitásának jelentős egyéni variabilitása, amelyet FSCPX-szel gátolva homogénebbé válik az adenzin receptor agonistákra adott válasz.

*Ex vivo* vizsgálatunk szerencsés véletlennek köszönhető sajátossága, hogy tisztán NBTI hatására nagyon erős volt az  $E_{max}$  csökkenése (mind a CPA, mind az adenzin E/c görbékénél; 15. A, B ábra) és az  $EC_{50}$  növekedése (a CPA E/c görbe esetében: 15. A ábra) a korábbi vizsgálatokkal összehasonlítva (Karsai és mtsai; 2006, 2007; Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014). Értelmezésünk szerint ez az NBTI interstitialis endogén adenzin szintet növelő hatásának tulajdonítható (3. táblázat). Ez indokoltá teszi azt a feltételezést, hogy a jelen *ex vivo* vizsgálat során a pitvarok kivételesen magas interstitialis adenzin-termelő képességgel rendelkeztek, lehetővé téve mind az NBTI, mind az FSCPX számára, hogy különösen erős hatást fejtsen ki az endogén adenzin interstitialis szintjére. Ezzel összhangban az RRM történetének eddigi legmagasabb  $c_x$  értékét mértük (4. táblázat). Korábban említettük, hogy hipotézisünk szerint az FSCPX enzimgátló sajátossága csak az NBTI-vel való kölcsönhatásában nyilvánulhat meg. Ezt meggyőzően alátámasztja, hogy az FSCPX előkezelés hatására a  $c_x$  jelentősen csökkent (100,2 nM-ról 6,73 nM-ra). Ez lehetővé tette számunkra, hogy továbbfejlesszük korábbi elképzelésünket az FSCPX irreverzibilis  $A_1$  receptor antagonizmuson kívüli hatásának mechanizmusáról.

$\emptyset$	+T <sub>4</sub>	Referencia
20.4 nM	-	Karsai és mtsai, 2006
18.5 nM	37 nM	Karsai és mtsai, 2007
45.08 nM	-	Kiss és mtsai, 2013
38.19 nM	58.75 nM	Pák és mtsai, 2014
100.2 nM	-	jelen <i>ex vivo</i> vizsgálat

4. táblázat. A csak NBTI-vel kezelt eu- és hyperthyreoid tengerimalac pitvarokban felhalmozódott interstitialis adenzin RRM-mel meghatározott ekvieffektív CPA koncentrációi.  $\emptyset$ : mérési eredmény euthyreoid pitvaron; +T<sub>4</sub>: mérési eredmény hyperthyreoid pitvaron.

A  $c_x$  értékek lehetőséget adtak olyan, hipotetikus adenzin E/c görbék létrehozására, amelyek mentesek az NBTI-re adott válaszként felhalmozódó endogén interstitialis adenzin torzító hatásától (17. ábra). Ezek a hipotetikus adenzin E/c görbék lehetővé teszik, hogy összehasonlítsuk a továbbfejlesztett receptor rezerv becslési módszerünket annak eredeti formájával. Az FSCPX+NBTI kezelt adenzin E/c görbe, amikor a régi módszerrel korrigáltuk, látványosan az új módszerrel korrigált párja fölött futott (17. ábra). Ez a jelenség alátámasztja azt az *in silico* vizsgálatban megfogalmazott feltételezést, hogy az eredeti módszer, amelyet két korábbi munkánk során alkalmaztunk (Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014), túlbecsüli és így túlkorrigálja az NBTI okozta torzulást FSCPX előkezelés után. Mivel ez a pontatlanság csak kismértékben érinti a magas adenzin koncentrációkhoz tartozó válaszokat, és mivel ezek a válaszok képezik az alapot a receptor rezerv megbecsléséhez (összehasonlítva a korrigált NBTI kezelt és a korrigált FSCPX+NBTI kezelt adenzin E/c görbék terminális szakaszát), az eredeti módszer csak kismértékben becslüli túl a kérdéses receptor rezervet (17. ábra). Természetesen a továbbiakban az új, továbbfejlesztett módszer alkalmazását ajánljuk.

Egy későbbi munkánk során, ami már nem része a jelen disszertációt megalapozó vizsgálatoknak, munkacsoportunk *in silico* reprodukálta a jelen értekezés *ex vivo* eredményeit. Ez megerősítette *ex vivo* vizsgálatunk azon megállapítását, hogy az FSCPX gátolja az endogén adenzin NBTI okozta interstitialis felhalmozódását, míg a kívülről beadott adenzin sorsát nem befolyásolja. Ez tovább erősíti azon hipotézisünket, hogy az FSCPX (irreverzibilis  $A_1$  receptor antagonistá viselkedése mellett) valahogyan az interstitialis adenzin termelést is képes csökkenteni (Szabó és mtsai, 2019).

## 6. Az új eredmények összefoglalása

A jelen értekezés alapjául szolgáló *in silico* vizsgálatunkban korábban izolált, ingerelt tengerimalac bal pitvaron adenzinnal és CPA-val ( $A_1$  adenzin receptor agonisták) felvett koncentráció-hatás (E/c) görbéket reprodukáltunk azzal a céllal, hogy validáljuk receptor rezerv becslő kvalitatív módszerünket, melyet az adenzin direkt negatív inotróp hatására vonatkozó  $A_1$  adenzin receptor rezerv meghatározására fejlesztettünk ki. Az adenzin élő szövetben gyors metabolizmusa miatt rövid féléletidejű endogén agonista, ami ezért nehezen vizsgálható *in vivo* és *ex vivo* rendszerekben. Eredményeink megerősítették módszerünk megbízhatóságát és potenciális jelentőségét agonista hatóanyagok tesztelése során. Számítógépes szimulációnk emellett rávilágított arra, hogy az eredeti *ex vivo* vizsgálat során használt két vegyület, az FSCPX (irreverzibilis  $A_1$  receptor antagonist) és az NBTI (adenzin transzport gátló) között, hatásaik szintjén, kölcsönhatás léphet fel: az FSCPX előkezelés gyengítheti az NBTI hatásait az  $A_1$  receptor agonistákkal felvett E/c görbékre, ami miatt receptor rezerv becslő módszerünk kismértékben túlbecsülheti az  $A_1$  receptor rezervet. Legjobb tudomásunk szerint ennek a megfigyelésnek nincs előzménye a szakirodalomban, ezért hipotézisünk igazolására egy *ex vivo* kísérletet dolgoztunk ki.

A jelen értekezés alapjául szolgáló *ex vivo* munkánk során az előző vizsgálatunkban szimulált *ex vivo* adenzin és CPA E/c görbéket vettük fel újra, de kibővített protokollt követve. Eredményeink tükrében finomítanunk kellett korábbi hipotézisünket az FSCPX és az NBTI közötti interakcióra vonatkozóan: az FSCPX előkezelés nem gátolja az NBTI azon hatásait, melyeket az exogén adenzin intracelluláris bontásának gátlásán keresztül fejt ki, csak azokat, amelyeket az endogén adenzin interstitialis koncentrációjának emelése révén (még az E/c görbék felvétele előtt). Az FSCPX tehát az  $A_1$  receptor tartós inaktiválásán kívül egy másik, eddig rejtve maradt hatásmechanizmussal is rendelkezik. Erre vonatkozóan felállított hipotézisünk szerint az FSCPX tartósan gátolhat egy (vagy több) olyan enzimet is, amely(ek) részt vesz(nek) az interstitialis adenzin termelésben. Ezen a mechanizmuson keresztül az FSCPX csökkentheti az endogén adenzin NBTI okozta interstitialis akkumulációját és ennek minden hatását az  $A_1$  receptor agonisták E/c görbéire. Igazoltuk korábbi *in silico* feltételezésünket is, miszerint receptor rezerv becslő módszerünk eredeti verziója kismértékben túlbecsüli az  $A_1$  receptor rezervet. A probléma megoldására módosítottuk módszerünket, a receptor rezerv becslésére a továbbiakban ezt az új módszert ajánljuk.

## 7. Summary of the findings

In our *in silico* study underlying the present thesis, we reproduced previous concentration-effect (E/c) curves generated in isolated, paced guinea pig left atria with adenosine and CPA, two A<sub>1</sub> adenosine receptor agonists, in order to validate our qualitative method for receptor reserve estimation that was developed to determine the A<sub>1</sub> adenosine receptor reserve for the direct negative inotropic effect of adenosine. In living tissues, adenosine has a short half-life due to its quick metabolism that makes investigations dealing with adenosine difficult in *in vivo* and *ex vivo* systems. Our results confirmed reliability of our method and its potential significance during screening assays of drugs with agonist properties. In addition, results of our computer simulations have suggested that FSCPX and NBTI, two chemicals used in the original *ex vivo* study, may interact with each other at the level of their effects: and FSCPX may attenuate effects of NBTI on the E/c curves of A<sub>1</sub> receptor agonists and thereby our method to estimate receptor reserve may slightly overestimate A<sub>1</sub> receptor reserve. To the best of our knowledge, this observation has no antecedents in the literature, so we developed an *ex vivo* experiment to support our hypothesis.

In our *ex vivo* investigation underlying the present thesis, we constructed again the *ex vivo* adenosine and CPA E/c curves simulated in the study described above, according to an extended protocol. In light of our results, we had to refine our previous hypothesis about the interaction between FSCPX and NBTI: FSCPX pretreatment does not blunt the effects of NBTI mediated by an inhibition of intracellular elimination of exogenous adenosine, it rather blunts the effects of NBTI mediated by an increase in interstitial concentration of endogenous adenosine (before the construction of the E/c curves). Thus, FSCPX, in addition to the permanent inactivation of the A<sub>1</sub> receptor, possesses another mechanism of action that remained uncovered to date. According to our hypothesis to address this phenomenon, FSCPX may permanently inhibit an (or some) enzyme(s) contributing to the formation of interstitial adenosine. Through this mechanism, FSCPX may moderate the interstitial accumulation of endogenous adenosine caused by NBTI and all the effects of this on the E/c curves of A<sub>1</sub> receptor agonists. In addition, we confirmed our *in silico* hypothesis, i.e. the original version of our method to determine receptor reserve slightly overestimates receptor reserve. To resolve this problem, we improved our method, and the use of this new method is recommended in the future for receptor reserve estimation.

## 8. Irodalom

### 8.1. A disszertáció elkészítéséhez felhasznált irodalom

1. Abbracchio, M.P.; Burnstock, G.; Boeynaems, J.M.; Barnard, E.A.; Boyer, J.L.; Kennedy, C.; Knight, G.E.; Fumagalli, M.; Gachet, C.; Jacobson, K.A.; Weisman, G.A. International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G protein coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol. Rev.* 2006, 58, 281–341. doi: 10.1124/pr.58.3.3
2. Albrecht-Küpper, B.E.; Leineweber, K.; Nell, P.G. Partial adenosine A<sub>1</sub> receptor agonists for cardiovascular therapies. *Purinergic Signal.* 2012, 105, 91–99. doi: 10.1007/s11302-011-9274-3
3. Alexander, S.P.H.; Mathie, A.; Peters, J.A. G protein-coupled receptors. *Br. J. Pharmacol.* 2011, 164, 5-113. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01649\_1.x.
4. Aljarari, N.M.H.; Sherif, D.S. A Pharmacological Characterization of Adenosine Receptors. *Drug discovery.* 2012, 2, 21-27. [http://www.discoveryjournals.org/drugdiscovery/current\\_issue/2012/A12.pdf](http://www.discoveryjournals.org/drugdiscovery/current_issue/2012/A12.pdf)
5. Antonioli, L.; Fornai, M.; Colucci, R.; Ghisu, N.; Da Settimo, F.; Natale, G.; Kastsiuchenka, O.; Duranti, E.; Viridis, A.; Vassalle, C.; La Motta, C.; Mugnaini, L.; Breschi, M.C.; Blandizzi, C.; Del Taca, M. Inhibition of adenosine deaminase attenuates inflammation in experimental colitis. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 2007, 322, 435–442. doi: 10.1124/jpet.107.122762
6. Belardinelli, L.; Shryock, J.C.; Song, Y.; Wang, D.; Srinivas, M. Ionic basis of the electrophysiological actions of adenosine on cardiomyocytes. *FASEB. J.* 1995, 9: 359-65. doi: 10.1096/fasebj.9.5.7896004
7. Biber, K.; Klotz, K.N.; Berger, M.; Gebicke-Harter, P.J.; van Calker, D. Adenosine A<sub>1</sub> receptor-mediated activation of phospholipase C in cultured astrocytes depends on the level of receptor expression. *J. Neurosci.* 1997, 17, 4956-64. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-13-04956.1997
8. Black, J.W.; Leff, P. Operational models of pharmacological agonism. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 1983, 220, 141–162. doi: 10.1098/rspb.1983.0093
9. Blackburn, M.R.; Vance, C.O.; Morschl, E.; Wilson, C.N. Adenosine receptors and inflammation. *Hand. Exp. Pharmacol.* 2009, 193, 215–269. doi: 10.1007/978-3-540-89615-9\_8

10. Bohm, M.; Meyer, W.; Mugge, A.; Schmitz, W.; Scholz, H. Functional evidence for the existence of adenosine receptors in the human heart. *Eur. J. Pharmacol.* 1985, 116:323–326. doi: 10.1016/0014-2999(85)90170-0
11. Boison, D. Adenosine kinase: Exploitation for therapeutic gain. *Pharmacol. Rev.* 2013, 65, 906–943. doi: 10.1124/pr.112.006361
12. Bono, M.R.; Fernandez, D.; Flores-Santibanez, F.; Roseblatt, M.; Sauma, D. CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. *FEBS Lett.* 2015, 589, 3454–3460. doi: 10.1016/j.febslet.2015.07.027.
13. Borah, P.; Deka, S.; Mailavaram, R.P.; Deb, P.K. P1 Receptor Agonists/Antagonists in Clinical Trials - Potential Drug Candidates of the Future. *Curr. Pharm. Des.* 2019, 25, 2792-2807. doi: 10.2174/1381612825666190716111245
14. Borea, P.A.; Gessi, S.; Merighi, S.; Vincenzi, F.; Varani, K. Pharmacology of adenosine receptors: The state of the art. *Physiol. Rev.* 2018, 98, 1591–1625. doi: 10.1152/physrev.00049.2017
15. Brown, J.H.; Goldstein, D. Differences in muscarinic receptor reserve for inhibition of adenylate cyclase and stimulation of phosphoinositide hydrolysis in chick heart cells. *Mol. Pharmacol.* 1986, 30, 566–570. PMID: 3023810
16. 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
17. Buchwald, P. A three-parameter two-state model of receptor function that incorporates affinity, efficacy, and signal amplification. *Pharmacol. Res. Perspect.* 2017, 5, e00311. doi:10.1002/prp2.311
18. Burnstock, G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007, 64, 1471–1483. doi: 10.1007/s00018-007-6497-0
19. Burnstock, G.; Fredholm, B.B.; North, R.A.; Verkhratsky, A. The birth and postnatal development of purinergic signalling. *Acta Physiol.* 2010, 199, 93–147. doi:10.1111/j.1748-1716.2010.02114.x
20. Burnstock, G.; Pelleg, A. Cardiac purinergic signalling in health and disease. *Purinergic Signal.* 2015, 11, 1–46. doi: 10.1007/s11302-014-9436-1
21. Burnstock, G. Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. *Front. Pharmacol.* 2017, 8, 661. doi: 10.3389/fphar.2017.00661
22. Camici, M.; Garcia-Gil, M.; Tozzi, M.G. The inside story of adenosine. *Int. J. Mol.*

Sci. 2018, 19, 784. doi:10.3390/ijms19030784

23. Cheng, R.K.Y.; Segala, E.; Robertson, N.; Deflorian, F.; Doré, A.S.; Errey, J.C.; Fiez-Vandal, C.; Marshall, F.H.; Cooke, R.M. Structures of Human A1 and A2A Adenosine Receptors with Xanthines Reveal Determinants of Selectivity. *Structure*. 2017, 25, 1275–1285. doi: 10.1016/j.str.2017.06.012

24. Colquhoun, D. Binding, gating, affinity and efficacy: the interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors. *Br. J. Pharmacol.* 1998, 125, 924–947. doi: 10.1038/sj.bjp.0702164

25. Colquhoun, D. The quantitative analysis of drug-receptor interactions: A short history. *Trends Pharmacol. Sci.* 2006, 27, 149–157. doi: 10.1016/j.tips.2006.01.008

26. Conant, A.R.; Jarvis, S.M. Nucleoside transport in guinea-pig myocardium. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1991, 309A, 415–418. doi: 10.1007/978-1-4899-2638-8\_95

27. Deb, P.K.; Deka, S.; Borah, P.; Abed, S.N.; Klotz, K.N. Agonists, Antagonists and Allosteric Modulators of A1 Adenosine Receptor: Current Status and Perspectives. *Curr. Pharm. Des.* 2019, 25, 2697-2715. doi: 10.2174/1381612825666190716100509.

28. Deussen, A. Metabolic flux rates of adenosine in the heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2000a, 362, 351–363. doi: 10.1007/s002100000318

29. Deussen, A. Quantitative integration of different sites of adenosine metabolism in the heart. *Ann. Biomed. Eng.* 2000b, 28, 877–883. doi: 10.1114/1.1308498

30. Deussen, A.; Stappert, M.; Schäfer, S.; Kelm, M. Quantification of extracellular and intracellular adenosine production: Understanding the transmembranous concentration gradient. *Circulation*. 1999, 99, 2041–2047. doi: 10.1161/01.CIR.99.15.2041

31. Deussen, A.; Weichsel, J.; Pexa, A. Features of adenosine metabolism of mouse heart. *Purinergic Signal*. 2006, 2, 663–668. doi: 10.1007/s11302-006-9013-3

32. Dhalla, A.K.; Shryock, J.C.; Shreeniwas, R.; Belardinelli, L. Pharmacology and therapeutic applications of A<sub>1</sub> adenosine receptor ligands. *Curr. Top. Med. Chem.* 2003, 3, 369–385. doi: 10.2174/1568026033392246

33. Elzein, E.; Zablocki, J. A<sub>1</sub> adenosine receptor agonists and their potential therapeutic applications. *Expert Opin, Investig, Drugs*. 2008, 17, 1901-10. doi: 10.1517/13543780802497284

34. Fenouillet, E.; Mottola, G.; Kipson, N.; Paganelli, F.; Guieu, R.; Ruf, J. Adenosine Receptor Profiling Reveals an Association between the Presence of Spare Receptors and Cardiovascular Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 5964. doi: 10.3390/ijms20235964

35. Finlay, D.B.; Duffull, S.B.; Glass, M. 100 years of modelling ligand-receptor binding and response: a focus on GPCRs. *Br. J. Pharmacol.* 2020, 177, 1472-1484. doi: 10.1111/bph.14988
36. Fountain, S.J.; Parkinson, K.; Young, M.T.; Cao, L.; Thompson, C.R.L.; North, R.A. An intracellular P2X receptor required for osmoregulation in *Dictyostelium discoideum*. *Nature*. 2007, 448, 200–203. doi: 10.1038/nature05926
37. Fredholm, B.B.; IJzerman, A.P.; Jacobson, K.A.; Klotz, K.N.; Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* 2001, 53, 527–552. PMID:11734617
38. Fredholm, B.B.; Johansson, S.; Wang, Y.Q. Adenosine and the regulation of metabolism and body temperature. *Adv. Pharmacol.* 2011a, 61, 77–94. doi: 10.1016/B978-0-12-385526-8.00003-5
39. Fredholm, B.B.; IJzerman, A.P.; Jacobson, K.A.; Linden, J.; Müller, C.E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors - an update. *Pharmacol. Rev.* 2011b, 63, 1–34. doi: 10.1124/pr.110.003285
40. Fredholm, B.B.; Frenguelli, B.G.; Hills, R.; IJzerman, A.P.; Jacobson, K.A.; Klotz, K.N.; Linden, J.; Müller, C.E.; Schwabe, U.; Stiles, G.L. Adenosine receptors (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology*. 2019, 4. doi: 10.2218/gtopdb/F3/2019.4
41. Geldenhuys, W.J.; Hanif, A.; Yun, J.; Nayeem, M.A. Exploring Adenosine Receptor Ligands: Potential Role in the Treatment of Cardiovascular Diseases. *Molecules*. 2017, 22, 917. doi: 10.3390/molecules22060917
42. Gesztelyi, R.; Zsuga, J.; Cseppentő, A.; Bajza, A.; Varga, A.; Szabó, J.Z.; Szentmiklósi, A.J. Special sensitization pattern in adenosine-induced myocardial responses after thyroxine-treatment. *J. Pharmacol. Sci.* 2003a, 91, 295–304, doi: 10.1254/jphs.91.295.
43. Gesztelyi, R.; Zsuga, J.; Hajdú, P.; Szabó J.Z.; Cseppentő, A.; Szentmiklósi, A.J. 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.* 2003b, 22, 501-13. PMID: 15113122
44. Gesztelyi, R.; Zsuga, J.; Juhász, B.; Dér, P.; Vecsernyés, M.; Szentmiklósi, A.J. 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, 1439–1453, doi: 10.1016/j.bulm.2004.03.001
45. Gesztelyi, R.; Zsuga, J.; Kemény-Beke, A.; Varga, B.; Juhász, B.; Tósaki, 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

46. Gesztelyi, R.; Kiss, Z.; Wachal, Z.; Juhász, B.; Bombicz, M.; Csépanyi, E.; Pák, K.; Zsuga, J.; Papp, C.; Galajda, Z.; Branzaniuc, K.; Porszász, R.; Szentmiklósi, A.J.; Tósaki, A. The surmountable effect of FSCPX, an irreversible A<sub>1</sub> adenosine receptor antagonist, on the negative inotropic action of A<sub>1</sub> adenosine receptor full agonists in isolated guinea pig left atria. *Arch. Pharm. Res.* 2013, 36, 293–305. doi: 10.1007/s12272-013-0056-z

47. Giraldo, J.; Vivas, N.M.; Vila, E.; Badia, A. Assessing the (a)symmetry of concentration-effect curves: Empirical versus mechanistic models. *Pharmacol. Ther.* 2002, 95, 21–45, doi: 10.1016/S0163-7258(02)00223-1.

48. Greene, S.J.; Sabbah, H.N.; Butler, J.; Voors, A.A.; Albrecht-Küpper, B.E.; Düngen, H.D.; Dinh, W.; Gheorghide, M. Partial adenosine A<sub>1</sub> receptor agonism: A potential new therapeutic strategy for heart failure. *Heart Fail. Rev.* 2016, 21, 95–102, doi: 10.1007/s10741-015-9522-7.

49. Greczer, M.; Pintér, A.; Zsuga, J.; Kemény-Beke, A.; Juhász, B.; Szodoray, P.; Tósaki, 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, 1061–1073. doi: 10.1139/y10-078

50. Greczer, M.; Zsuga, J.; Majoros, L.; Pintér, A.; Kemény-Beke, A.; Juhász, B.; Tósaki, 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, 1074–1083. doi: 10.1139/y10-089

51. Gupta, R.C.; Neumann, J.; Watanabe, A.M. Comparison of adenosine and muscarinic receptor-mediated effects on protein phosphatase inhibitor-1 activity in the heart. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993; 266: 16-22. PMID: 8392548

52. Habermacher, C.; Dunning, K.; Chataigneau, T.; Grutter, T. Molecular structure and function of P2X receptors. *Neuropharmacology.* 2016; 104; 18–30. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.07.032

53. Headrick, J.P.; Hack, B.; Ashton, K.J. Acute adenosinergic cardioprotection in ischemic-reperfused hearts. *Am. J. Physiol.* 2003, 285, 1797–1818, doi: 10.1152/ajpheart.00407.2003.

54. Headrick, J.P.; Peart, J.N.; Reichelt, M.E.; Haseler, L.J. Adenosine and its receptors in the heart: regulation, retaliation and adaptation. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011, 1808, 1413-28. doi: 10.1016/j.bbamem.2010.11.016

55. Headrick, J.P.; Ashton, K.J.; Rose'meyer, R.B.; Peart, J.N. Cardiovascular adenosine receptors: Expression, actions and interactions. *Pharmacol. Ther.* 2013, 140, 92–111, doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.06.002.
56. Herbert, J.M.; Savi, P. P2Y<sub>12</sub>, a new platelet ADP receptor, target of clopidogrel. *Semin. Vasc. Med.* 2003, 3, 113–122. doi: 10.1055/s-2003-40669
57. Jacobson, K.A.; Müller, C.E. Medicinal chemistry of adenosine, P2Y and P2X receptors. *Neuropharmacology.* 2016, 104, 31–49. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.12.001
58. Jacobson, K.A.; Tosh, D.K.; Jain, S.; Gao, Z.G. Historical and Current Adenosine Receptor Agonists in Preclinical and Clinical Development. *Front. Cell. Neurosci.* 2019, 13, 124. doi: 10.3389/fncel.2019.00124
59. Jacobson, K.A.; Reitman, M.L. Adenosine-Related Mechanisms in Non-Adenosine Receptor Drugs. *Cells.* 2020, 9, 956; doi:10.3390/cells9040956
60. Jakubík, J.; Randáková, A.; Chetverikov, N.; El-Fakahany, E.E.; Doležal, V. The operational model of allosteric modulation of pharmacological agonism. *Scientific Reports.* 2020, 10, 14421 doi: 10.1038/s41598-020-71228-y
61. Kaczmarek, E.; Koziak, K.; Seigny, J.; Siegel, J.B.; Anrather, J.; Beaudoin, A.R.; Bach, F.H.; Robson, S.C. Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 33116–33122. doi: 10.1074/jbc.271.51.33116
62. Karsai, D.; Zsuga, J.; Juhász, B.; Dér, P.; Szentmiklósi, A.J.; 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, 103–109. doi:10.1097/01.fjc.0000196239.51018.a0
63. Karsai, D.; Gesztelyi, R.; Zsuga, J.; Jakab, A.; Szendrei, L.; Juhász, B.; Bak, I.; Szabó, G.; Lekli, I.; Vecsernyés, M.; Varga, E.; Szentmiklósi, J.; Influence of hyperthyroidism on the effect of adenosine transport blockade assessed by a novel method in guinea pig atria. *Cell Biochem. Biophys.* 2007, 47, 45–52. doi: 10.1385/CBB:47:1:45
64. Kenakin, T.P. *Pharmacologic Analysis of Drug-Receptor Interaction.* Lippincott-Raven. 1997. ISBN: 0-397-51815-3.
65. Kenakin, T.P. *A Pharmacology Primer: Techniques for More Effective and Strategic Drug Discovery;* Academic Press: 2018. ISBN: 978-0128139578
66. Khakh, B.S.; Burnstock, G.; Kennedy, C.; King, B.F.; North, R.A.; Séguéla, P.; Voigt, M.; Humphrey P.P.A. *International Union of Pharmacology. XXIV. Current status of the*

nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol. Rev.* 2001, 53, 107–118. PMID: 11171941

67. Kirsch, G.E.; Codina, J.; Birnbaumer, L.; Brown, A.M. Coupling of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels to A<sub>1</sub> receptors by G proteins in rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* 1990, 259, 820–6. doi: 10.1152/ajpheart.1990.259.3.H820

68. Kiss, Z.; Pák, K.; Zsuga, J.; Juhász, B.; Varga, B.; Szentmiklósi, A.J.; Haines, D.D.; Tószaki, A.; Gesztelyi, R. The guinea pig atrial A<sub>1</sub> adenosine receptor reserve for the direct negative inotropic effect of adenosine. *Gen. Physiol. Biophys.* 2013, 32, 325–335, doi: 10.4149/gpb\_2013041.

69. Kurachi, Y.; Nakajima, T.; Sugimoto, T. On the mechanism of activation of muscarinic potassium channels by adenosine in isolated atrial cells: Involvement of GTP-binding proteins. *Pflügers Arch.* 1986, 407, 264–74. doi: 10.1007/BF00585301

70. Latini, S.; Pedata, F. Adenosine in the central nervous system: Release mechanisms and extracellular concentrations. *J. Neurochem.* 2001, 79, 463–484. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00607.x

71. Maliszewski, C.R.; Delespesse, G.J.; Schoenborn, M.A.; Armitage, R.J.; Fanslow, W.C.; Nakajima, T.; Baker, E.; Sutherland, G.R.; Poindexter, K.; Birks, C. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *J. Immunol.* 1994, 153, 3574–3583. PMID: 7930580

72. Mathôt, R.A.; Appel, S.; van Schaick, E.A.; Soudijn, W.; IJzerman, A.P.; Danhof, M. High-performance liquid chromatography of the adenosine A<sub>1</sub> agonist N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine and the A<sub>1</sub> antagonist 8-cyclopentyltheophylline and its application in a pharmacokinetic study in rats. *J. Chromatogr.* 1993, 620, 113–120. doi: 10.1016/0378-4347(93)80058-c

73. Morey, T.E.; Belardinelli, L.; Dennis, D.M. Validation of Furchgott's method to determine agonist-dependent A<sub>1</sub>-adenosine receptor reserve in guinea-pig atrium. *Br. J. Pharmacol.* 1998, 123, 1425–1433. doi: 10.1038/sj.bjp.0701747

74. Motulsky, H.J.; Christopoulos, A. Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting; GraphPad Software Inc.: San Diego, CA, USA, 2004. ISBN-13: 978-0195171808

75. Möser, G.H.; Schrader, J.; Deussen, A. Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. *Am. J. Physiol.* 1989, 256, 799–806. doi: 10.1152/ajpcell.1989.256.4.C799

76. Müller, C.E.; Jacobson, K.A. Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs. *Biochim Biophys Acta.* 2011, 1808, 1290–308. doi: 10.1016/j.bbame.2010.12.017

77. Müller, C.E.; Baqi, Y.; Namasivayam, V. Agonist and antagonist for purinergic receptors. *Methods Mol. Biol.* 2020, 2041, 45-64. doi: 10.1007/978-1-4939-9717-6\_3
78. Neal, M.J. *Medical Pharmacology at a Glance*. Wiley-Blackwell (7<sup>th</sup> edition). 2012. ISBN: 978-1-118-30647-5
79. Neubig, R.R.; Spedding, M.; Kenakin, T.; Christopoulos, A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 2003, 55, 597–606. doi:10.1124/pr.55.4.4
80. Neumann, J.; Gupta, R.C.; Jones, L.R.; Bodor, G.S.; Bartel, S.; Krause, E.G.; Pask, H.T.; Schmitz, W.; Scholz, H.; Watanabe, A.M. Interaction of beta-adrenoceptor and adenosine receptor agonists on phosphorylation. Identification of target proteins in mammalian ventricles. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1995, 27, 1655-67. doi: 10.1016/s0022-2828(95)90689-4
81. Ontyd, J.; Schrader, J. Measurement of adenosine, inosine, and hypoxanthine in human plasma. *J. Chromatogr.* 1984, 307, 404–9. doi: 10.1016/s0378-4347(00)84113-4
82. Pák, K.; Papp, C.; Galajda, Z.; Szerafin, T.; Varga, B.; Juhász, B.; Haines, D.; Szentmiklósi, A.J.; Tósaki, A.; Gesztelyi, R. Approximation of A<sub>1</sub> adenosine receptor reserve appertaining to the direct negative inotropic effect of adenosine in hyperthyroid guinea pig left atria. *Gen. Physiol. Biophys.* 2014, 33, 177–188. doi: 10.4149/gpb\_2013079.
83. Pák, K.; Zsuga, J.; Képes, Z.; Erdei, T.; Varga, B.; Juhász, B.; Szentmiklósi, A.J.; Gesztelyi, R. The effect of adenosine deaminase inhibition on the A<sub>1</sub> adenosinergic and M<sub>2</sub> muscarinergic control of contractility in eu- and hyperthyroid guinea pig atria. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2015, 388, 853–868. doi: 10.1007/s00210-015-1121-6
84. Pastor-Anglada, M.; Pérez-Torras, S. Who Is Who in Adenosine Transport. *Front. Pharmacol.* 2018, 9, 627. doi: 10.3389/fphar.2018.00627
85. Pavan, B.; IJerman, A.P. 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
86. Peleli, M.; Fredholm, B.B.; Sobrevia, L.; Carlström, M. Pharmacological targeting of adenosine receptor signaling. *Mol. Asp. Med.* 2017, 55, 4-8. doi: 10.1016/j.mam.2016.12.002.
87. Prinz, H. Hill coefficients, dose–response curves and allosteric mechanisms. *J. Chem. Biol.* 2010, 3, 37–44. doi: 10.1007/s12154-009-0029-3

88. Prism 7 Curve Fitting Guide. GraphPad Software Inc. GraphPad Curve Fitting Guide; GraphPad Software Inc.: La Jolla, CA, USA, 2016. Available online: <https://s3.amazonaws.com/cdn.graphpad.com/faq/2/file/Prism-7-Curve-Fitting.pdf> (accessed on 8 March 2017 and refreshed on 9 July 2018).
89. Rafehi, M.; Müller, C.E. Tools and drugs for uracil nucleotide-activated P2Y receptors. *Pharmacol. Ther.* 2018, 190, 24–80. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.04.002
90. Reiss, A.B.; Grossfeld, D.; Kasselmann, L.J.; Renna, H.A.; Vernice, N.A.; Drewes, W.; Konig, J.; Carsons, S.E.; DeLeon, J. Adenosine and the Cardiovascular System. *Am. J. Cardiovasc. Drugs.* 2019, 19, 449–464. doi: 10.1007/s40256-019-00345-5
91. Ruffolo, Jr.R.R. Review important concepts of receptor theory. *J. Auton. Pharmacol.* 1982, 2, 277–295, doi: 10.1111/j.1474-8673.1982.tb00520.x.
92. Saito, H.; Nishimura, M.; Shinano, H.; Makita, H.; Tsujino, I.; Shibuya, E.; Sato, F.; Miyamoto, K.; Kawakami, Y. Plasma concentration of adenosine during normoxia and moderate hypoxia in humans. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999, 159, 1014–1018. doi: 10.1164/ajrccm.159.3.9803100
93. Schenone, S.; Brullo, C.; Musumeci, F.; Bruno, O.; Botta, M. A<sub>1</sub> receptors ligands: past, present and future trends. *Curr. Top. Med. Chem.* 2010, 10, 878-901. doi: 10.2174/156802610791268729
94. Seemann, W.K.; Wenzel, D.; Schrage, R.; Etscheid, J.; Bödefeld, T.; Bartol, A.; Warnken, M.; Sasse, P.; Klöckner, J.; Holzgrabe, U.; et al. Engineered Context-Sensitive Agonism: Tissue-Selective Drug Signaling through a G Protein-Coupled Receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2017, 360, 289–299, doi: 10.1124/jpet.116.237149.
95. Sheth, S.; Brito, R.; Mukherjea, D.; Rybak, L.P.; Ramkumar, V. Adenosine receptors: Expression, function and regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 2024–2052. doi: 10.3390/ijms15022024
96. Shryock, J.C.; 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
97. Srinivas, M.; Shryock, J.C.; Scammells, P.J.; Ruble, J.; Baker, S.P.; Belardinelli, L. A novel irreversible antagonist of the A<sub>1</sub>-adenosine receptor. *Mol. Pharmacol.* 1996, 50, 196-205. PMID: 8700113
98. Srinivas, M.; Shryock, J.C.; Dennis, D.M.; Baker, S.P.; Belardinelli, L. Differential A<sub>1</sub> adenosine receptor reserve for two actions of adenosine on guinea pig atrial myocytes. *Mol. Pharmacol.* 1997, 52, 683-91. doi: 10.1124/mol.52.4.683

99. Staehr, P.M.; Dhalla, A.K.; Zack, J.; Wang, X.; Ho, Y.L.; Bingham, J.; Belardinelli, L. (2013) Reduction of free fatty acids, safety, and pharmacokinetics of oral GS-9667, an A<sub>1</sub> adenosine receptor partial agonist. *J. Clin. Pharmacol.* 2013, 53, 385-392. doi: 10.1002/jcph.9
100. Szabó A, Erdei T, Viczján G, Kiss R, Zsuga J, Papp C, Pintér Á, Juhász B, Szilvássy Z, Gesztelyi R. An Advanced in silico Modelling of the Interaction between FSCPX, an Irreversible A<sub>1</sub> Adenosine Receptor Antagonist, and NBTI, a Nucleoside Transport Inhibitor, in the Guinea Pig Atrium. *Molecules.* 2019, 24, 1-16. doi: 10.3390/molecules24122207
101. Szentmiklósi, A.J.; Cseppentő, A.; Harmati, G.; Nánási, P.P. Novel trends in the treatment of cardiovascular disorders: site- and event- selective adenosinergic drugs. *Curr Med Chem.* 2011a, 18, 1164-87. doi: 10.2174/092986711795029753
102. Szentmiklósi A.J.; Cseppentő, A.; Gesztelyi, R.; Zsuga, J.; Kortvély, A.; Harmati, G.; Nánási P.P. Xanthine derivatives in the heart: blessed or cursed? *Curr Med Chem.* 2011b; 18: 3695-706. doi: 10.2174/092986711796642391
103. Yegutkin, G.G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008, 1783, 673–694. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.01.024
104. Zhang, J.; Belardinelli, L.; Jacobson, K.A.; Otero, D.H.; Baker, S.P. Persistent activation by and receptor reserve for an irreversible A<sub>1</sub>-adenosine receptor agonist in DDT1 MF-2 cells and in guinea pig heart. *Mol. Pharmacol.* 1997, 52, 491-8. doi: 10.1124/mol.52.3.491



Nyilvántartási szám: DEENK/74/2021.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Erdei Tamás Dániel  
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Erdei, T. D.**, Szabó, A. M., Lampé, N., Szabó, K., Kiss, R., Zsuga, J., Papp, C., Pintér, Á., Szentmihályi, J. A., Szilvássy, Z., Juhász, B., Gesztelyi, R.: FSCPX, a chemical widely used as an irreversible A1 adenosine receptor antagonist, modifies the effect of NBTI, a nucleoside transport inhibitor, by reducing the interstitial adenosine level in the guinea pig atrium. *Molecules*. 23 (9), 1-17, 2018.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23092186>  
IF: 3.06
2. Zsuga, J., **Erdei, T. D.**, Szabó, K., Lampé, N., Papp, C., Pintér, Á., Szentmihályi, J. A., Juhász, B., Szilvássy, Z., Gesztelyi, R.: Methodical Challenges and a Possible Resolution in the Assessment of Receptor Reserve for Adenosine, an Agonist with Short Half-Life. *Molecules*. 22 (5), 1-17, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules22050839>  
IF: 3.098

### További közlemények

3. Lampé, N., Priksz, D., **Erdei, T. D.**, Bombicz, M., Kiss, R., Varga, B., Zsuga, J., Szerafin, T., Csanádi, Z., Balla, G., Balla, J., Szilvássy, Z., Gesztelyi, R., Juhász, B.: Negative Inotropic Effect of BGP-15 on the Human Right Atrial Myocardium. *J. Clin. Med.* 9 (5), 1-18, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm9051434>  
IF: 3.303 (2019)
4. Szabó, A. M., Viczján, G., **Erdei, T. D.**, Simon, I., Kiss, R., Szentmihályi, J. A., Juhász, B., Papp, C., Zsuga, J., Pintér, Á., Szilvássy, Z., Gesztelyi, R.: Accuracy and Precision of the Receptorial Responsiveness Method (RRM) in the Quantification of A1 Adenosine Receptor Agonists. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (24), 6264-6277, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20246264>  
IF: 4.556





5. Szabó, A. M., **Erdei, T. D.**, Viczján, G., Kiss, R., Zsuga, J., Papp, C., Pintér, Á., Juhász, B., Szilvássy, 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*. 24 (12), 1-16, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24122207>  
IF: 3.267
6. Zsuga, J., Móré, E. C., **Erdei, T. D.**, Papp, C., Kolozsváriné Harsányi, S., Gesztelyi, R.: Blind spot for sedentarism: redefining the disease of physical inactivity in view of circadian system and the irisin/BDNF axis.  
*Front. Neurol.* 9, 1-13, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2018.00818>  
IF: 2.635
7. Kemény-Beke, Á., Bodnár, B., **Erdei, T. D.**, Gesztelyi, R., Ujhelyi, Z., Bácskay, I.: Szempontok a megfelelő műkönyccsepp kiválasztásához a száraz szem betegség kezelésében.  
*Gyógyszerészet*. 62, 722-725, 2018.
8. Papp, C., Pák, K., **Erdei, T. D.**, Juhász, B., Seres, I., Szentpéteri, A., Kardos, L., Szilasi, M., Gesztelyi, R., Zsuga, J.: Alteration of the irisin-brain-derived neurotrophic factor axis contributes to disturbance of mood in COPD patients.  
*Int. J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* 12, 2023-2033, 2017.  
IF: 2.917
9. Tajti, G., Pák, K., Képes, Z., **Erdei, T. D.**, Fodor, A., Mikáczó, A., Zsuga, J., Szilasi, M., Gesztelyi, R.: Asthma bronchiale-val kezelt betegek inzulinérzékeny és inzulinrezisztens-csoportjainak összehasonlítása.  
*Med. Thorac.* 68 (3), 193-199, 2015.
10. Pák, K., Zsuga, J., Képes, Z., **Erdei, T. D.**, Varga, B., Juhász, B., Szentmiklósi, J. A., 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.* 388 (8), 853-868, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-015-1121-6>  
IF: 2.376





11. Pák, K., Kiss, Z. M., **Erdei, T. D.**, Képes, Z., Gesztelyi, R.: Új lehetőség farmakológiai agonisták receptorközeli koncentrációjának becslésére: a receptorális válaszkészség módszer (RRM). *Acta Pharm. Hung.* 84, 38-52, 2014.

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 25,212**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6,158**

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, 2021.03.01.



## 9. Tárgyszavak

**Magyar tárgyszavak:** adenzin, A<sub>1</sub> adenzin receptor, operatív modell, receptoriális válaszkésztség módszer, RRM, receptor rezerv, inotrópia, CPA, FSCPX, NBTI, pitvar, tengerimalac

**Angol tárgyszavak:** adenosine, A<sub>1</sub> adenosine receptor, operational model, receptorial responsiveness method, RRM, receptor reserve, inotropy, CPA, FSCPX, NBTI, atrium, guinea pig

## 10. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Szilvássy Zoltán egyetemi tanárnak, egyetemünk rektorának, hogy lehetővé tette munkám elvégzését a DE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetben.

Köszönöm témavezetőm, Dr. Gesztelyi Rudolf egyetemi docens (DE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet) segítségét munkám során.

Köszönöm munkacsoportunk tagjainak segítségét: Dr. Lampé Nóra, Szabó Katalin, Viczján Gábor és Dr. Óvári Ignác PhD hallgatóknak, valamint Juhász Ildikó és Dávid Anna Mária asszisztenseknek (DE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet).

Köszönöm intézetünk többi dolgozójának segítségét is: Dr. Juhász Béla egyetemi docensnek, továbbá Dr. Kozma Mariannak, Dr. Priksz Dánielnek és Dr. Varga Balázsnak.

Köszönetet mondanék a családomnak, különösen édesanyámnak, aki mindig mellettem állt és támogatott.

PhD munkám feltételeit a „HU-MATHS-IN – Magyar Ipari Innovációs Matematikai Szolgáltatási Hálózat tevékenységének elmélyítése” pályázat (EFOP-3.6.2-16-2017-00015) biztosította.

További segítséget jelentett a „Szív- és Érkutatási Kiválóságközpont (IRONHEART)” pályázat (GINOP-2.3.2-15-2016-00043), a Klinikai Kutatások Tematikus Hálózatának Kialakítása és Nemzetköziesítése (KLI-K-K)” pályázat (EFOP-3.6.2-16-2017-00009), a Tématerületi Kiválósági Program 2019 (ED\_18-1-2019-0028), az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-19-3 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programja (egyedi pályázati azonosító: ÚNKP-19-3-I-DE-308), valamint a TKP2020-IKA-04 számú projektje, ami a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból biztosított támogatással a 2020-4.1.1-TKP2020 pályázati program finanszírozásában valósult meg.