

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A tiroxin kezelés hatása az
adenozinerg mechanizmusokra
tengerimalac pitvarizomzaton**

Dr. Gesztelyi Rudolf

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
FARMAKOLÓGIAI ÉS FARMAKOTERÁPIAI INTÉZET
Debrecen, 2005

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A tiroxin kezelés hatása az
adenozinerg mechanizmusokra
tengerimalac pitvarizomzaton**

Dr. Gesztelyi Rudolf

Témavezető: dr. Szentmiklósi József

Programvezető: dr. Gergely Lajos

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
FARMAKOLÓGIAI ÉS FARMAKOTERÁPIAI INTÉZET
Debrecen, 2005

„When you can measure what you are speaking about, and express it in numbers, you know something about it, but when you cannot express it in numbers your knowledge is of a meagre and unsatisfactory kind; it may be beginning of knowledge, but you have scarcely, in your thoughts, advanced to the stage of science, whatever the matter may be.”

Lord Kelvin

Tartalomjegyzék

Rövidítések	1
1. Bevezetés és irodalmi áttekintés	3
1.1 Az adenosin	3
1.2 Az adenosin receptorai	4
1.3 Az adenosin keletkezése, eliminációja és transzportja	5
1.4 Az adenosin szívhatásai	7
1.5 Az A ₁ receptor jelátvitelére tengerimalac bal pitvaron	10
1.6 Módszerek az interstitialis adenosin koncentrációjának becslésére	12
1.7 A szív hyperthyreosisban	14
1.8 Célkitűzések.....	16
2. Anyagok és módszerek.....	18
2.1 Anyagok	18
2.3 Protokollok	22
2.4 Adatfeldolgozás	24
3. Eredmények	27
3.1 A biológiai paraméterek változása az in vivo és in vitro kezelések során .	27
3.2 A tiroxin kezelés hatása az adenosin receptor agonisták és a P-site aktivátorok negatív inotrop effektusára	28
3.3 A tiroxin kezelés befolyása a nukleozid transzport gátlók és az adenosin dezamináz gátlók hatására	35
3.4 A tiroxin kezelés befolyása a cGMP-stimulált 3',5'-ciklikus nukleotid foszfodiészteráz (PDE ₂) gátlásának hatására	39
3.5 Koncentrációbecslés regresszióanalízissel	40
4. Megbeszélés	47
4.1 Az extracelluláris és intracelluláris adenosin kötőhelyek aktiválhatóságának változása tiroxin kezelt tengerimalacok pitvarán	47
4.2 A nukleozid transzport és az adenosin dezamináz gátlása által létrehozott változások elemzése hyperthyreoid pitvaron	50
4.3 A PDE ₂ gátlásának módosult hatása hyperthyreoid pitvaron	54
4.4 A ₁ receptor agonisták koncentrációbecslésének új lehetősége	57
4.5 Általános következtetések.....	61

6. Összefoglalás	63
7. Irodalom	65
8. Saját közlemények	74
9. Köszönetnyilvánítás.....	76

Rövidítések

/Megjegyzés: az írásmódban praktikusságra törekedtem akár az egyöntetűség rovására is, ezért a kifejezetten anatómiai, szövettani és patológiai kifejezéseket latin, a speciális vegyületneveket pedig angol formájukban igyekeztem használni./

AC = adenilcikláz

A₁ receptor = A₁ adenzin receptor

ADA = adenzin dezamináz

Ado = adenzin

[Ado]_{ISF} = az interstitialis folyadék Ado koncentrációja

ADP = adenzin-5'-difoszfát

AMP = adenzin-5'-monofoszfát

ARA-A = 9-β-D-arabinofuranozid (9-β-D-arabinofuranoside)

ATP = adenzin-5'-trifoszfát

AV = atrioventricularis

cAMP = 3',5'-ciklikus adenzin monofoszfát

CF = coformycin

cGMP = 3',5'-ciklikus guanozin monofoszfát

ClAdo = 2-chloroadenosine

CPA = N⁶-cyclopentyladenosine

CPX = DPCPX

DAdo = 2'-deoxiadenozin (2'-deoxyadenosine)

DCF = 2'-deoxycoformycin

DP = dipyridamol (dipyridamole)

DPCPX = 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine

E/[A] = koncentráció-hatás

EHNA = *erythro*-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine

ENT1 = ekvibratív és nitrobenzylthioinosine-nal gátolható nukleozid transzporter

K_{Ach/Ado} = muszkarin-aktivált K⁺ csatorna

L_{Ca} = L-típusú Ca²⁺ csatorna

M = mól/l

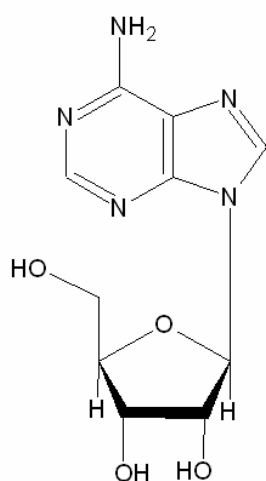
MC = metakolin (acetyl- β-methylcholine)

NBTI = S-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine
NECA = 5'-(N-ethylcarboxamido)adenosine
NO = nitrogénmonoxid
NT = szarkolemmális nukleozid transzport
PDE = 3',5'-ciklikus nukleotid foszfodiészteráz
PDE₂ = cGMP-stimulált 3',5'-ciklikus nukleotid foszfodiészteráz
PDE₃ = cGMP-gátolt 3',5'-ciklikus nukleotid foszfodiészteráz
PLB = foszfolambán
8-PT = 8-fenilteofillin (8-phenyl-theophylline)
RIA = radioimmunoassay
R-PIA = (R)-N⁶-(1-methyl-2-phenylethyl)adenosine
RRM = receptoriális válaszkészség módszer (receptorial responsiveness method)
T₃ = L-trijódtironin
T₄ = L-tiroxin (L-tetrajódtironin)
S = a T₄ oldószere („szolvens”)
SD = standard deviáció
SEM = standard hiba (standard error of the mean)
SAH = S-(5'-adenozil)-L-homocisztein
SR = szarkoplazmatikus retikulum /izomsejtbeli SER (simafelszínű endoplazmatikus retikulum)/
SERCA = SR Ca²⁺-ATP-áz (SR Ca²⁺-pumpa)
VERA = verapamil

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

A fejlett országokban a daganatos betegségek mellett a szív- és érrendszeri megbetegedések jelentik a legnagyobb kihívást mind a várható élettartam, mind az életminőség szempontjából. A még nagyrészt kiaknázatlan lehetőségek között tartják számon a szív intrinzik védekezőképességének gyógyszeres fokozását, melynek egyik lehetséges célpontját a szív protektív adenozinerg mechanizmusai képezik.

1.1 Az adenozin



1. ábra. Adenozin

Az adenozin (Ado) adeninből és ribózból álló ubikviter molekula, amely az élő szervezetek legfontosabb primer energiatároló molekulájának, az ATP-nek (adenozin-5'-trifoszfát) a prekursora és bomlásterméke, melynek megfelelő mennyisége szükséges a sejtek energetikai egyensúlyához (1. ábra). Az utóbbi nyolc évtized során fény derült szabályozó funkciójára is, amely az egész testre kiterjedően érinti a sejt- és szöveti szintű növekedést, differenciálódást és a metabolizmust. Összhangban azzal, hogy nagy mennyiségben való keletkezése az ATP reszintézis zavarának, tehát az adott szövet kimerülésének illetve sérülésének a jelzője, az Ado csaknem valamennyi emlősszövetben részt vesz protektív és reparatív funkciók mediálásában (összefoglalóként ld.: Shryock és Belardinelli, 1997; Fredholm és mtsai, 2001; Headrick és mtsai, 2003; Linden, 2005). Az 1970-es években vált fokozatosan egyértelművé, hogy az Ado és az adenin nukleotidok (AMP, ADP, ATP) hatásai döntően specifikus receptorok közvetítésével jönnek létre (Cobbin és mtsai, 1974; Burnstock, 1976), amelyek között az Ado receptorok önálló csoportot képeznek (Burnstock, 1978).

1.2 Az adenozin receptorai

Az egyszerű purinszármazékokat megkötő és arra választ generáló struktúrákat purinerg receptoroknak (vagy purinoceptoroknak) nevezték el (Burnstock, 1976). A purinoceptorokat rövidesen két típusba sorolták az alapján, hogy aktivációjuk Ado-ra (P_1 típus) vagy ATP-re (P_2 típus) kifejezettebb-e (Burnstock, 1978). Ma a P_1 típus tagjait Ado receptoroknak hívják, alkalmazván azt az elvet, hogy a receptorok névadója a hozzájuk legaffinisabb illetve a kapcsolódás révén a legnagyobb választ kiváltó endogén anyag legyen. A Nemzetközi Farmakológiai Társaság (IUPHAR) jelenleg négy Ado receptor altípust tart nyilván: az A_1 , A_{2A} , A_{2B} és A_3 receptorokat (összefoglalóként ld.: Alexander és mtsai, 2001a; Fredholm és mtsai, 2001). Néhányan megkülönböztetnek egy ötödik altípust, az A_4 -et (Cornfield és mtsai, 1992), amelyet agyban és aortán karakterizáltak farmakológiai módszerekkel, de amelyet idáig még nem sikerült klónozni (összefoglalóként ld.: Sommerschild és Kirkeboen, 2000; Hutchinson és Scammells, 2004).

Az A_1 - A_3 altípusok G-proteinhez kapcsolt, a citoplazmatikus membránban elhelyezkedő receptorok. Az A_1 és A_3 receptorok gátló jellegű, míg az A_{2A} és A_{2B} altípusok serkentő G-proteinhez kötődnek, ennek megfelelően előbbiek gátolják, utóbbiak serkentik az adenilcikláz (AC) működését. Az A_1 és A_3 receptorok serkentik a foszfolipáz C és D működését is (az A_3 altípus szignalizációjának ez a fő útvonala). Az A_1 receptor nyitja mind a szarkolemmális, mind a mitokondriális ATP-szenzitív K^+ csatornákat (utóbbiakat feltehetően az A_3 receptor is). A supraventricularis szívizomban az A_1 altípus a muszkarinos K^+ csatorna ($K_{ACh/Ado}$) konduktanciáját is növeli, kamrán a legtöbb species esetén ez a hatás elhanyagolható a $K_{ACh/Ado}$ alacsony denzitása miatt. Az A_{2A} és A_{2B} receptorok esetében is léteznek cAMP-független útvonalak, amelyek aktiválni látszanak a foszfolipáz C-t és a mitogén aktiválta protein kinázokat (MAPK). A hasonló működésű A_1 és A_3 , illetve A_{2A} és A_{2B} receptorpárok tagjai között sajátos különbség, hogy az A_1 altípus legalább egy, az A_{2A} pedig több nagyságrenddel érzékenyebb az Ado-ra, mint az A_3 illetve A_{2B} forma. Ez megnehezíti az utóbbi két altípus önálló szerepének vizsgálatát az Ado mediálta folyamatokban. A feltételezett A_4 altípus nem kapcsolódik G-proteinhez, hanem közvetlenül

befolyásolná a membrán K^+ konduktanciáját (összefoglalóként ld.: Shryock és Belardinelli, 1997; Sommerschild és Kirkebøen, 2000; Headrick és mtsai, 2003; Hutchinson és Scammells, 2004). A vizsgált emlős fajok Ado receptor altípusai nagyfokú homológiát mutatnak egymással. A klónozott Ado receptorok (tyúk, birka, szarvasmarha, egér, patkány, tengerimalac, nyúl, kutya, ember) közül a humán receptorok aminosav-szekvenciájához a következő speciesek receptorai állnak a legközelebb: A_1 : tengerimalac; A_{2A} : kutya; A_{2B} : patkány; A_3 : kutya (Fredholm és mtsai, 2001).

Szűk értelemben véve nem receptor a sejtmembrán belső felszínéhez asszociált AC Ado kötőhelye, az ún. P-site, de Ado-nal való kapcsolódása az enzim gátlásában nyilvánul meg (Tesmer és mtsai, 2000). A P-site relatíve szelektíven aktiválható P-site agonistákkal, mint például a 2'-deoxiadenozin (DAdo) és a 9-beta-D-arabinofuranosid (ARA-A), ami az A_1 és A_3 receptorok stimulációjához hasonló, de annál gyengébb hatásokat vált ki.

Az egyes Ado receptor altípusokhoz szelektív agonisták és antagonisták állnak rendelkezésre. Az A_1 altípus leggyakrabban használt és legszelektívebb agonistái a 2-chloro- N^6 -cyclopentyladenosine (CCPA) és az N^6 -cyclopentyladenosine (CPA). Az A_1 antagonisták közül a leggyakrabban alkalmazott és legszelektívebb a 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (CPX vagy DPCPX) (összefoglalóként ld.: Alexander és mtsai, 2001a; Fredholm és mtsai, 2001). A természetes xantin-származékok (koffein, teofillin) közepesen erősen és egyformán gátolják az A_1 és az A_2 receptorokat. A 8-phenyl-theophylline (8-PT) anyavegyületétől (teofillin) nagyobb affinitásában különbözik.

1.3 Az adenzin keletkezése, eliminációja és transzportja

Fiziológiás körülmények között az Ado mind az extra-, mind az intracelluláris térben folyamatosan termelődik és eliminálódik.

Az extracelluláris keletkezésű Ado a sejtekből (neuronok, thrombocyta és sok más sejtféle) kijutott adenin nukleotidok (ATP, ADP, AMP, cAMP) katabolitja, a folyamat sebesség-meghatározó lépése az ekto-nukleotidázok (elsődlegesen az ekto-5'-nukleotidáz (CD73) illetve az ekto-apiráz (CD39)) által katalizált AMP – Ado átalakulás.

Intracellulárisan az Ado zöme szintén AMP-ből keletkezik, főleg endo-5'-nukleotidáz, kisebb mennyiségben alkalikus foszfatázok katalizálta folyamatban. Az AMP energetikailag intakt körülmények között csak kisebb részben bomlik Ado-ra, nagyobb részét az AMP-dezamináz inozin-monofoszfáttá (IMP) alakítja, amely inozinná defoszforilálódik. Hypoxiában viszont az AMP bontása az Ado keletkezésének irányában tolódik el. Az Ado kis mennyiségét S-adenozil-homocisztein-hidroláz (SAH-hidroláz) állítja elő S-adenozil-homociszteiből (SAH).

Az interstitialis Ado eliminációja három úton történhet: kimosódás a keringéssel, extracelluláris adenzin dezamináz (ADA) általi bontás és transzport az adott szövet sejtjeibe. A kimosódás nagy perfúziójú szövetben számottevő lehet, az extracelluláris ADA általi bontás viszont alárendelt jelentőségű, tengerimalac szívben például nem is kell vele számolni az ADA kizárólagos intracelluláris előfordulása miatt (Schutz és mtsai, 1981). Szívben az extracelluláris Ado-t elsősorban a vasculatura endotheliuma, másodsorban a cardiomyocyták veszik fel.

Intracellulárisan az Ado részben AMP-vé alakul az Ado kináz révén, részben az intracelluláris ADA inozinná dezaminálja. Szívben különösen aktív dezaminálás zajlik az endotheliumban (összefoglalóként ld.: Sommerschild és Kirkeboen, 2000; Deussen, 2000a; Fredholm és mtsai, 2001; Headrick és mtsai, 2003; Linden, 2005).

A sejtek membránjában kétféle, ekvibratív (diffúziót facilitáló; ENT) és koncentratív (aktív transzportra képes; CNT) nukleozid transzporter fordulhat elő (összefoglalóként ld.: Thorn és Jarvis, 1996). A szívben döntően, a cardiomyocytákon az általánosan elfogadott álláspont szerint kizárólag ENT, azon belül is ENT1, vagyis ekvibratív és nitrobenzylthioinosine (NBTI) szenzitív (es típusú) transzporter található (Conant és Jarvis, 1994). Következésképp, noha a szív képes a rajta áthaladó vérből koncentráció-gradiens ellenében is Ado-t felvenni (Dekanski és mtsai, 2004), a myocardialis nukleozid transzport (NT) irányát és intenzitását elsődlegesen a membrán két oldalán fennálló Ado koncentrációk szabják meg (Deussen és mtsai, 1999). Noha a bruttó intracelluláris Ado produkció mintegy tízszerese a bruttó interstitialisnak, az erőteljes sejten belüli Ado újrahasznosításnak köszönhetően a myocardiumra nettó intracelluláris Ado elimináció és nettó interstitialis Ado termelés a jellemző. Ennek megfelelően a sejtmembránon keresztüli NT a sejt belseje felé irányul (Deussen és mtsai, 1999).

Hypoxiában ugyanakkor az Ado kináz gátlódik (az ADA aktivitása is csökken; Szentmiklósi és mtsai, 1983), ami jelentős intracelluláris Ado felhalmozódást okozva (főleg a cardiomyocytákban) megfordítja a NT-ot. Ez a mechanizmus a normoxiában Ado fogyasztó cardiomyocytákat hypoxiában Ado termelőkké teszi. Ezzel összhangban, a NT blokádja általában fokozza az Ado sejtfelszíni receptorokon keresztül mediálódó hatásait (összefoglalóként ld.: Deussen, 2000a, b; De Jong és mtsai, 2000), de nagyfokú ischaemiában ez gátlásba fordul át, mivel az Ado kijutása akadályozott a sejtekből (Schreieck és Richardt, 1999).

Ischaemiában ugyanakkor az intracelluláris acidózis hatékonyan gátolja az endo-5'-nukleotidázt is (Bak és Ingwall, 1998), ami mérsékli (de nem akadályozza meg) az Ado kináz gátolt állapota miatti extra Ado-termelést. Az Ado kináz és az endo-5'-nukleotidáz aktivitásának szuppressziója egyrészt csökkenti az ischaemiás myocardium energiaigényét, másrészt megemeli a szöveti Ado-szintet, melynek révén beindítja a szív protektív és reparatív adenozinerg mechanizmusait, harmadrészt pedig valamelyest védi a sejtek AMP készletét, ami a reperfúzió során gyorsabb ATP reszintézist tesz lehetővé.

Az intenzív és szabályozott enzimatikus és transzporttevékenység következtében az Ado rövid félélettidejű és erősen kompartmentalizált molekula, melynek mennyiségi növekedése a sejtek energetikai egyensúlyát felborító zavar következménye és egyben protektív folyamatok beindítója (összefoglalóként ld.: Deussen, 2000a, b; Fredholm és mtsai, 2001; Headrick és mtsai, 2003).

1.4 Az adenozin szívhatásai

A purinerg mechanizmusok közül kiemelkedő jelentőségűek a szívre kifejtett hatások. Az adenin nukleotidok biológiai aktivitását elsőként erőteljes negatív chronotrop és negatív dromotrop hatásuk kapcsán figyelték meg (Drury és Szent-Györgyi, 1929). Ezzel összhangban az adenin-származékok hatékonyan fékezik meg a tachyarrhythmiákat, maga az Ado pedig endogén antiarrhythmias anyagnak tekinthető (Belardinelli és mtsai, 1989; Conti és mtsai, 1995). Az Ado a sinuatrialis csomó sejtjein mérsékelten gátolja az ingerképzést (negatív chronotropia), az atrioventricularis (AV) csomó területén nagymértékben deprimálja az akciós potenciált (negatív dromotropia) (összefoglalóként ld.:

Belardinelli és mtsai, 1995). Ennek megfelelően a bolusban adott Ado (3-18 mg) a supraventricularis tachycardiák minden típusában hatékonyan csökkenti a kamrai frekvenciát az AV átvezetés átmeneti blokkja révén (<1 perc), tartós hatása azonban elsősorban a sinuatrialis és AV csomó eredetű tachycardiákban van. A fenti hatások pitvarspecifikusak, a kamrai eredetű tachyarrhythmiai (egy speciális típust kivéve) Ado-rezisztensek, amit differenciáldiagnosztikailag hasznosítanak is (összefoglalóként ld.: Fazekas, 1999). Az Ado pitvari hatásainak hátterében A_1 receptor mediálta K^+ -konduktancia növekedés áll, amely független a cAMP szintjétől (ún. direkt hatás). Ugyanakkor az Ado mind pitvaron, mind kamrán erőteljesen csökkenti a β -adrenerg receptoraktiváció által fokozott AC működés (emelkedett cAMP-szint és protein kináz A általi foszforiláció) következményeit (indirekt hatás) (Belardinelli és mtsai, 1995). Az Ado mint antiarrhythmias szer ezért a III. csoportba került besorolásra, mivel gátolja a sympathicus izgalom által fokozott L-típusú Ca^{2+} áramot (Vaughan Williams és Somberg, 1998). Terápiásan az Ado rövid plazma-félélettideje (<10 másodperc) akut alkalmazásra előnyös, de a hosszútávú védelem szempontjából hátrányos. Továbbá, a gyors elimináció a kutatás számára megnehezíti az Ado koncentrációjának pontos meghatározását receptora közelében, így spekulatívvá teszi az Ado koncentráció-hatás ($E/[A]$) viszonyainak elemzését (összefoglalóként ld.: Deussen, 2000a, b).

A cardiovascularis betegségek közül kiemelkedő népegészségügyi jelentőséggel bírnak a szív ischaemiás eredetű elváltozásai. Az Ado antiarrhythmias hatásán túl a szívben, elsősorban kóros körülmények között, fontos szerepet játszanak az általa mediált protektív és regeneratív folyamatok. Ezeket négy fő csoportba lehet sorolni: 1. az oxigén kínálat/igény arányának növelése; 2. ischaemiás prekondicionálás és poszt kondicionálás; 3. gyulladásgátlás; 4. az angiogenesis serkentése.

Ad 1.: Ide tartoznak az A_1 receptor által közvetített negatív trophatások, amelyek csökkentik a szív munkáját és javítják a diastolés telődést; az A_1 receptor mediálta preszinaptikus gátlás a szív noradrenerg idegein, amelyik hozzájárul a sympathicus izgalom ellensúlyozásához; továbbá a coronariák döntően A_{2A} , kisebb mértékben A_{2B} mediálta dilatációja. Noha a klasszikus teóriával (Berne, 1963) szemben fiziológiai körülmények között az endogén Ado nem látszik befolyásolni a szív perfúzióját és nem felelős a coronaria-keringés regionális heterogenitásáért sem (Stepp és mtsai, 1996), hypoxiában többlet mennyiségű

Ado keletkezik (Berne, 1963), ami viszont jelentékenyen hozzájárul a coronaria-dilatációhoz (Laxson és mtsai, 1993; összefoglalóként ld.: Tune és mtsai, 2002). Az adenozinerg vazodilatáció részben az endotheliális nitrogénmonoxid (NO) termelés fokozásán, részben direkt simaizom-hatáson alapszik, mindkettő elsősorban A_{2A} receptor mediált. *In vivo* (és vérrel perfundált *in vitro* rendszerben) hozzájárul a microcirculatio javításához a szintén A_{2A} receptor mediálta thrombocytá aggregáció-gátlás is.

Ad 2.: Az ischaemiás prekondicionálás lényege, hogy megelőző rövid hypoxiás epizódok védő hatást fejtenek ki egy későbbi hosszabb hypoxiás időszak alatt, majd ezt követő reperfúzió során (Murry és mtsai, 1986; összefoglalóként ld.: Tósaki, 1995; Tsai és mtsai, 2004). Az Ado kardioprotektív hatásait kisebb részben nem-receptorális (ún. metabolikus) úton, nagyobb részt viszont a cardiomyocytákon található A_1 és A_3 receptorok közvetítéssel fejt ki, melynek mechanizmusa még nem teljesen tisztázott (Peart és mtsai, 2003). A ventricularis cardiomyocyták membránjában kis mennyiségben találtak A_{2A} receptort is (ez felelős kamrán az interstitialis Ado koncentráció ($[Ado]_{ISF}$) emelkedésekor megfigyelhető kismértékű pozitív inotrop hatásért), amelynek az ischaemia utáni reperfúzió indukálta apoptózis gátlásában lehet szerepe (összefoglalóként ld.: Sommerschild és Kirkeboen, 2000; Headrick és mtsai, 2003).

Ad 3.: Az antiinflammatorikus hatás egyes immunrendszeri és kötőszöveti sejtek gátlásán alapul. A neutrophil granulocyták adhézíóját és szabadgyök-termelését a rajta elhelyezkedő A_{2A} receptorok izgalma gátolja. A_{2B} receptorokat hízósejteken, fibroblastokon és endothel-sejteken találtak, egyes adatok szerint gátolják a fibrózist (ezáltal a postischaemiás cardialis remodelinget) és fokozzák az endotheliális ekto-5'-nukleotidáz expressziót és aktivitást (növelve az $[Ado]_{ISF}$ -t). Az A_3 receptor aktivációja gátolja a mastocyták degranulációját. Ezzel szemben a neutrophil granulocyták A_1 (és talán A_3) receptorai fokozzák a kemotaktikus ingerekre adott választ.

Ad 4.: Az angiogenesis elősegítésében mind a négy Ado receptor típus részt vesz, elsősorban az endotheliális angiogén faktorok felszabadításának fokozása és az antiangiogén anyagok expressziójának csökkentése révén hatnak, de serkentik a mastocyták angiogén faktorainak kibocsátását is (összefoglalásként ld.: Linden, 2005).

Az Ado gyors transzportja és metabolizmusa jelentősen megnehezíti az Ado koncentrációjának becslését az egyes szöveti kompartmentekben, ami hátráltatja az adozinerg mechanizmusok vizsgálatát. Ezt jól példázza, hogy az Ado membránális transzportjának iránya a szívben, főleg a cardiomyocytákban egészen a közelmúltig vita tárgyát képezte (összefoglalóként ld.: Deussen, 2000a, b), noha régóta ismert volt, hogy az endogén és az exogén Ado hatása növelhető a nukleozid transzporterek gátlásával (Szentmiklósi és mtsai, 1982; Van Belle, 1993). A NT gátlása potenciózza az antiarrhythmias (Wilbur és Marchlinski, 1997) és az ischaemia elleni protektív hatékonyságot is (összefoglalóként ld.: De Jong és mtsai, 2000). Ismereteink egzaktságának további növeléséhez fontos lenne a kutatás eszköztárának bővítése olyan eljárásokkal, amelyek az Ado szintjének pontosabb becslését tennék lehetővé, különösen az Ado kötőhelyeinek mikrokörnyezetében.

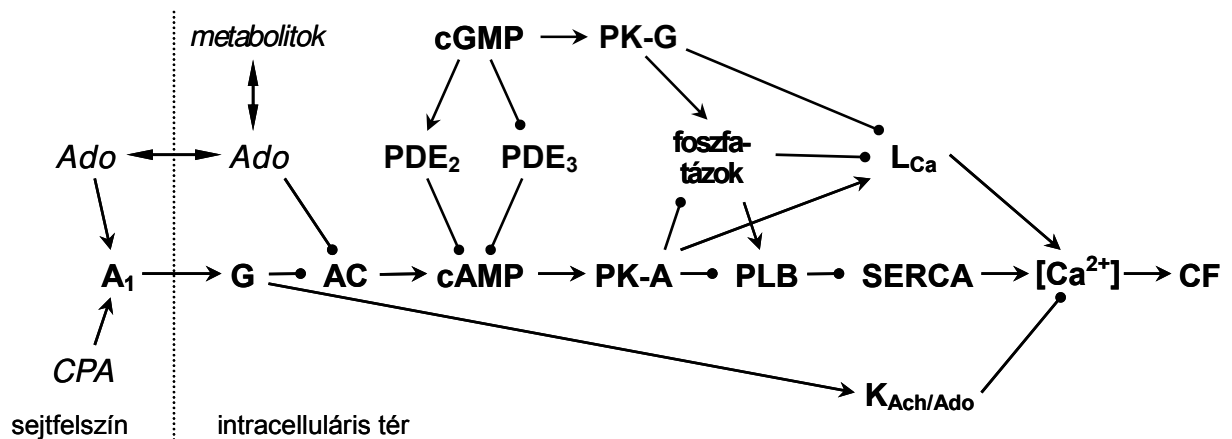
Megállapíthatjuk továbbá, hogy a sejtfelszíni Ado receptorok részletesen vizsgált funkciói mellett viszonylag kevés figyelmet kaptak az intracelluláris Ado kötőhelyek által mediált folyamatok. Tekintettel azokra az eredményre, amelyek intracelluláris támadáspontú adozinerg mechanizmusokról tanúskodnak fiziológiás illetve kóros körülmények között (Szentmiklósi és mtsai, 1982, 1983; Rosenthal és Lowenstein, 1991), érdemes lenne ezeket a funkciókat részletesebben vizsgálni.

1.5 Az A₁ receptor jelátvitеле tengerimalac bal pitvaron

Az Ado cardiomyocytákon kifejtett hatásainak többségét a G-protein kapcsolt sejtfelszíni A₁ receptorok mediálják (Gardner és Broadley, 1999; összefoglalóként ld.: Shryock és Belardinelli, 1997). Az A₁ receptor stimulációja az M₂ muszkarinerg receptorral közösen használt K⁺ csatorna (K_{Ach/Ado}) nyitását (ezáltal az ún. befelé egyenirányító K⁺ áram erősödését) és az AC gátlását okozza (összefoglalóként ld.: Belardinelli és mtsai, 1995). A cAMP szintjének csökkenése gátolja a cAMP-függő protein kináz A aktivitását, ami egyrészt serkenti az intracelluláris foszfoprotein foszfatázokat (Gupta és mtsai, 1993), másrészt felszabadítja a PLB gátló aktivitását a SERCA-n (Gupta és mtsai, 1993; Neumann és mtsai, 1995), harmadrészt gátolja az L-típusú Ca²⁺ csatornát (L_{Ca}) (Jahnel és

mtsai, 1992). A SERCA felelős a citoszólbeli szabad Ca^{2+} diastole alatti visszapumpálásáért az SR-be, ezért csökkent működése a sejt (szarkolemmális Ca^{2+} csatornán keresztüli) Ca^{2+} veszteséhez vezet, ami csökkenti a későbbiekben a kontrakciós erőt. Az L-típusú inward Ca^{2+} áram gyengülése az akciós potenciál platófázisában szintén a kontrakciós erő csökkenésének irányában hat (összefoglalóként ld.: Bers, 2001). Az intracelluláris Ado kötőhelyek közül az AC-on található P-site a legjobban feltérképezett, melyhez kötődve az Ado gyenge gátlást hoz létre az enzimen (Tesmer és mtsai, 2000). A folyamatot összefoglaló 2. ábrán a cGMP és az általa szabályozott három protein, a két PDE és a protein kináz G nem részei az adenozinerg útvonalnak tengerimalac bal pitvaron (összefoglalóként ld.: Shirayama és Pappano, 1996; Bers, 2001). Feltűntetésük azért történt, mert a főleg ADA gátlóként használt EHNA a jelenleg leggyakrabban alkalmazott szelektív bénítója (a PDE-okon belül) a PDE_2 -nek (Alexander és mtsai, 2001b).

Mint az a 2. ábrán látható, az inotropiát meghatározó intracelluláris Ca^{2+} -szintet az A_1 receptorfunkció három ponton, az L_{Ca} , a SERCA és a $\text{K}_{\text{Ach/Ado}}$ aktivitásának szabályozásával befolyásolja. E három tényező egymáshoz képesti jelentősége még nem teljesen tisztázott. Széles körben elfogadott vélemény szerint elsősorban a befelé egyenirányító K^+ áram növekedése felelős az A_1 receptor agonisták direkt (bazális cAMP-szint melletti) negatív inotrop hatásáért, amely hiperpolarizálja a sejtet és rövidíti az akciós potenciál időtartamát (Kurachi és mtsai, 1986; Belardinelli és mtsai, 1995). K^+ csatorna blokkolókkal végzett kísérletek alapján Ford és Broadley (1999) arra következtettek, hogy a $\text{K}_{\text{Ach/Ado}}$ aktivációja főleg a kontrakció időtartamát, kialakulási és lecsengési gyorsaságát befolyásolja, de alig érinti a kontrakciós erő amplitúdóját. Az A_1 receptor agonisták az emelkedett cAMP-szint következtében fokozott L-típusú Ca^{2+} áramot erőteljesen csökkentik, míg a bazális cAMP-szint melletti L-típusú Ca^{2+} áramot csak kisebb mértékben gátolják (és azt is csak pitvaron) (Belardinelli és mtsai, 1995). A SERCA – PLB komplex szerepe alárendelt jelentőségűnek látszik az Ado direkt negatív inotrop hatásában pitvaron, mivel a PLB, amelyre a SERCA felé tartó szabályozási utak konvergálnak, pitvaron csak kis mennyiségben van jelen (Shenoy és mtsai, 2001).



2. ábra. A viszonylag stabil és szelektív A_1 receptor agonista CPA, valamint a gyorsan metabolizálódó Ado szignálizációjának konvergálása a kontrakciós erőre tengerimalac bal pitvari munkaizomsejten. $\rightarrow$: serkentés vagy mennyiség-növelés; $\bullet$: gátlás vagy mennyiség-csökkenés; $\longleftrightarrow$: egyensúlyi folyamat; Ado: adenosin; CPA: N^6 -cyclopentyladenosine; A_1 : A_1 Ado receptor; metabolitok: az Ado metabolitjai; G: GTP-kötő fehérje (G-protein); AC: adenilcikláz; cAMP: 3',5'-ciklikus adenosin monofoszfát; cGMP: 3',5'-ciklikus guanozin monofoszfát; PDE_2 : cGMP-stimulált 3',5'-ciklikus nukleotid foszfodiészteráz; PDE_3 : cGMP-gátlott 3',5'-ciklikus nukleotid foszfodiészteráz; PK-A: cAMP-függő protein kináz A; PK-G: cGMP-függő protein kináz G; PLB: foszfolambán; SERCA: a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATP-áza; foszfatazok: intracelluláris foszfoprotein foszfatazok; L_{Ca} : L-típusú Ca^{2+} csatorna; $K_{Ach/Ado}$: muszkarin aktiválta K^+ csatorna; $[Ca^{2+}]$: a citoszól Ca^{2+} koncentrációja az akciós potenciál platófázisában; CF: kontrakciós erő.

1.6 Módszerek az interstitialis adenosin koncentrációjának becslésére

Többféle módszert alkalmaznak a működő szív közvetlenül nem mérhető $[Ado]_{ISF}$ -jának becslésére, a rágcsálók vizsgálata során kapott értékek a nanomoláris nagyságrendtől a mikromolárisig terjednek (1. táblázat).

A legmagasabb bazális $[Ado]_{ISF}$ értékeket a myocardialis interstitium mikrodialízisével (160 nM – 2.8 μ M), illetve az endocardiális „well” technikával (3.6 – 4.6 μ M) nyerték. (A „well” porózus falú korong vagy zacskó, amelynek folyadéktartalma a meghatározandó szövetrel szoros kontaktusba helyezve annak interstitialis folyadékával ekvilibrálódik a permeábilis anyagokra nézve. Ezek koncentrációit a „well” folyadékában lemérve következtetni lehet a szöveti

koncentrációkra.) A kutyán kapott eredmények hasonlóak voltak, 900 nM – 1.8 μ M közötti értékekről számoltak be (Van Wylen és mtsai, 1990; Wang és mtsai, 1992).

A peri- vagy epicardialis transzudátumból illetve a „well” folyadék alapján meghatározott bazális $[Ado]_{ISF}$ patkányban és tengerimalacban 100 – 400 nM között mozog. Kutyából származó újabb értékek hasonló a tartományban vannak, 370 és 990 nM között (Gidday és mtsai, 1992; Kekesi és mtsai, 2002). Az epicardialis és az endocardialis értékek figyelemreméltó, egy nagyságrendnyi transzmurális $[Ado]_{ISF}$ különbséget mutatnak (Zhu és mtsai, 1991; Zhu és mtsai, 1992; ld.: 1. táblázat).

Becslés myocardialis interstitiumból mintavételezett folyadék alapján

Mikrodialízis perfuzátum

160 nM; *in vitro* patkány; Ninomiya és mtsai, 2002
 270 nM; *in vivo* patkány; Headrick, 1996
 400-500 nM; *in vitro* patkány; Harrison és mtsai, 1998
 470 nM; *in vitro* patkány; Van Wylen és mtsai, 1992
 2.8 μ M; *in vivo* patkány; Obata és mtsai, 2001

Peri- vagy epicardialis transzudátum, infuzátum, illetve „well” tartalma

$\approx$ 100-250 nM; *in vitro* patkány; Perlini és mtsai, 1998
 180 nM; *in vitro* tengerimalac; DP (0.1 μ M): $\approx$ 1 μ M; $\Delta[Ado]_{ISF}$: 820 nM; Decking és mtsai, 1988
 191 nM; *in vitro* tengerimalac; DP (10 μ M): 2 μ M; $\Delta[Ado]_{ISF}$: 1.8 μ M; Mohrman és Heller, 1990
 300 nM; *in vitro* tengerimalac; Zhu és mtsai, 1991 (endocardialis „well” módszerrel viszont: 3.6 μ M)
 327 nM; *in vitro* tengerimalac; Zhu és mtsai, 1992 (endocardialis „well” módszerrel viszont: 4.6 μ M)

Becslés a nagyvérköri arteriális és coronaria-vénás Ado szintek alapján

2.6-9.4 nM; *in vitro* tengerimalac; Gorman és mtsai, 1991
 6.8 nM; *in vitro* tengerimalac; DP (10 μ M): 191 nM; $\Delta[Ado]_{ISF}$: 184.2 nM; Wangler és mtsai, 1989
 20-25 nM; *in vitro* tengerimalac; Kroll és mtsai, 1992
 34 nM; *in vitro* tengerimalac; NBTI (10 μ M): 94 nM; $\Delta[Ado]_{ISF}$: 60 nM; Deussen és mtsai, 1999
 (összefoglalóként ld.: Bassingthwaighe, 1992)

1. táblázat. Szemelvény az irodalomban található $[Ado]_{ISF}$ értékekből, melyeket jelenleg is elfogadott és alkalmazott módszerekkel határoztak meg tengerimalac és patkány szívben. A koncentrációk a sorok elején bazális $[Ado]_{ISF}$ értékek. Ahol DP-t vagy NBTI-t is alkalmaztak (a zárójelben megadott koncentrációban), ott feltüntettük a kialakult $[Ado]_{ISF}$ -t és annak növekedését ($\Delta[Ado]_{ISF}$) is. Az *in vitro* és *in vivo* megjelölések a vizsgálat típusát jelzik; nM: nmol/l; μ M: μ mol/l.

A bazális $[Ado]_{ISF}$ legalacsonyabb becsléseit (tengerimalacon 2.6 – 25 nM, kutyán 92 – 220 nM között) az ún. „axially distributed modeling” segítségével

határozták meg, ami az Ado arteriovenózus koncentrációkülönbsége, a hematokrit és a coronaria-perfúzió alapján végzett elég összetett számítás (Kroll és Stepp, 1996; Stepp és mtsai, 1996). Ezzel a módszerrel korábbi kísérletek adataiból is lehet becslést tenni (Bassingthwaighe, 1992).

A bazális $[Ado]_{ISF}$ értékek különbségei egyrészt az egyes módszerek által okozott szöveti sérülések eltérő mértékére, másrészt a mintavétel által megcélzott szöveti kompartmentek különbségeire vezethetők vissza. A becsült $[Ado]_{ISF}$ értékek három nagyságrendre kiterjedő változatossága (nem számítva az azonos módszerrel kapott transzmurális különbséget) túlságosan nagy módszerfüggést mutat. Ezzel összhangban, az $[Ado]_{ISF}$ eltérő módszerekkel meghatározott növekedése NT-gátló DP hatására szintén elég széles tartományban mozog (1. táblázat). A becsült $[Ado]_{ISF}$ erős függése a jelenleg alkalmazott módszerektől új, megbízhatóbb eljárás kidolgozásának szükségességét mutatja, vagy legalábbis egy olyan módszerét, amely képes az $[Ado]_{ISF}$ nagy biológiai jelentőségű változásainak meghatározására. A sejtfelszíni Ado receptorok mikrokozonyezetének Ado-szintje és annak változása különösen informatívak lennének, mivel az Ado hatásai döntően e receptorokon keresztül mediálódnak.

1.7 A szív hyperthyreosisban

A thyroid hormonok (L-tiroxin: T_4 ; L-trijódtironin: T_3) fontos induktorai a normális szöveti differenciációnak az egyedfejlődés elején, és később is nélkülözhetetlen elemei az anyagcsere egyensúlyának. A keringésbe kórosan nagy mennyiségben jutó T_3 és T_4 számos közvetett és közvetlen változást indukál a cardiovascularis rendszerben, melyeket a T_3 és a sejtekben T_3 -má alakuló T_4 elsősorban magi receptorokon keresztül hoz létre (összefoglalóként ld.: Zhang és Lazar, 2000). Eredő hatásuk az anyagcsere általános fokozódása, amely a keringéssel szemben támasztott igény növelésével többletmunkát hárít a szívre. Ennek eredménye a perctérfogat növekedése és a perifériás ellenállás ezzel párhuzamos csökkenése, ezáltal tartós hyperdynamias keringés kialakulása.

Ezen túl, a myocardium közvetlenül is az egyik legválaszképesebb szövet thyroid hormonokkal szemben (rövid összefoglalóként ld.: Klein és Ojamaa, 2001). Hyperthyreosisban emelkedik a β -adrenerg receptorok száma (Bilezikia és

Loeb, 1983) és affinitása (Pracyk és Slotkin, 1991), viszont az AC kisebb aktivitása ezt ellensúlyozza, ezért a β -adrenerg jelátvitel hatékonysága nem változik lényegesen hyperthyreoid cardiomyocytákon (Ojamaa és mtsai, 2000b). Ezzel szemben a sympathicus izgalom érvényesülését segíti elő a fiziológiás ellensúlyozó mechanizmusok visszaszorulása: a muszkarinerg receptorszám és működés (Ishac és Pennefather 1983; Waisberg és Shainberg, 1992), továbbá az A_1 adenzinerg funkció (Szentmiklósi és mtsai, 1992; Kaasik és mtsai, 1994) egyaránt csökkenést mutat hyperthyreosisban.

A thyreoid hormonok tartós jelenléte koncentrációfüggően befolyásolja a szív Ca^{2+} homeosztázisát (Takács és mtsai, 1985). Hyperthyreoid állapotban nő a ryanodine receptorok expressziója (Arai és mtsai, 1991) és a szarkolemmális L-típusú Ca^{2+} áram (Mager és mtsai, 1992; Kreuzberg és mtsai, 2000). Jól ismert továbbá, hogy a thyreoid hormonok megemelik a myocardialis SR (szarkoplazmás retikulum) Ca^{2+} -ATP-áz (SERCA) expresszióját és csökkentik a hozzá kapcsolódó gátló foszfolambán (PLB) mennyiségét, növelve ezáltal a SERCA/PLB arányt (összefoglalóként ld.: Carr és Kranias, 2002). Ez pozitív inotrop és pozitív lusitrop hatású, de a PLB megkevesbedése miatt kisebb lesz a β -adrenerg stimulációra adott pozitív inotrop és lusitrop válaszkészség (Kaasik és mtsai, 1997b).

A thyreoid hormonok jelentősen fokozzák a szív anyagcseréjét is, mely megnövekedett oxigén- és szubsztrátfogyasztáshoz, idővel hypertrophiához, majd mitokondriális DNS és enzimfeszaporodáshoz vezet (Goldenthal és mtsai, 2004). A makroerg foszfáttartalom (ATP, kreatin-foszfát) azonban csökken, amihez a hyperthyreoid myocardium csökkent maximális munkavégző-képessége társul (Queiroz és mtsai, 2002). A relatív energiahányhoz hozzájárul az oxidatív foszforiláció thyreoid hormon általi szétkapcsolása, ami a felszabadított kémiai energia egy részének hővé alakulását okozza ATP-termelés helyett (összefoglalóként ld.: Kadenbach, 2003). A tartós T_4 kezelés ugyanakkor az ischaemiás prekondicionáláshoz hasonló módon növeli a szív ischaemiával szembeni tűrőképességét. Ezen túlmenően, a krónikus T_4 expozíció potenciózza más eljárások kardioprotektív hatását, köztük az ischaemiás prekondicionálását is (összefoglalóként ld.: Pantos és mtsai, 2004). Ezek az újabb adatok érdekes lehetőségeket vetnek fel és inspirálják a thyreoid hormonok szívhatásainak tanulmányozását.

1.8 Célkitűzések

Kísérleteink során négy, egymással összefüggő témát vizsgáltunk izolált, elektromosan ingerelt tengerimalac pitvarizomzaton:

1. Ismert, hogy az intracelluláris Ca^{2+} citoszólikus koncentrációját szabályozó fehérjék közös célpontjai a thyreoid hormonok és az Ado kontrakciós erőre konvergáló hatásainak (Kaasik és mtsai, 1997a, b; Kreuzberg és mtsai, 2000; Ojamaa és mtsai, 2000a; Shenoy és mtsai, 2001). Ennek ellenére az adozinerg mechanizmusokat a hyperthyreosis patogenézisében nem vizsgálták olyan mértékben, mint azt a téma jelentősége megkívánná. Az intracelluláris támadáspontú adozinerg mechanizmusok kutatása ezen belül is elhanyagolt területnek számít, mivel hatásait általában elfedi a sejtfelszíni Ado receptorok funkciójának markánsabb megnyilvánulása. A korábbi vizsgálatok azonban arra utalnak, hogy kóros körülmények között (pl. hypoxiában) az intracelluláris mechanizmusok fokozott jelentőségre tehetnek szert (Szentmiklósi és mtsai, 1982, 1983). Célunk annak eldöntése volt, hogy az extracelluláris Ado receptorok mellett az intracelluláris Ado kötőhelyek részvétele az adozinerg hatásokban változik-e a tartós T_4 expozíció által teremtett miliőben.

2. Az előbbi felvetéshez kapcsolódva összehasonlítottuk a szöveti Ado mennyiségét és eloszlását eltérően befolyásoló NT inhibitorok és ADA bénítók hatását euthyreoid illetve hyperthyreoid pitvarizomzaton. Az NT inhibitorok megfelelő oxigén-ellátású szívben növelik a sejten kívüli és csökkentik a sejten belüli Ado koncentrációt, ezzel párhuzamosan emelik a teljes Ado mennyiséget a szövetben (Deussen, 2000a). Az ADA gátlók intracelluláris lokalizációjukból adódóan elsősorban a citoplazmatikus Ado koncentrációját fokozzák, különösen tengerimalac szívben, ahol az ADA csak intracellulárisan fordul elő (Schutz és mtsai, 1981). Az NT és az ADA inhibitorok hatásának összehasonlításával tehát az intracelluláris Ado koncentráció jelentőségét kívántuk vizsgálni az eltérő thyreoid státuszú pitvarokon.

3. A cGMP-stimulált 3',5'- ciklikus nukleotid foszfodiészteráz (PDE₂) EHNA általi gátlása növelte az L-típusú Ca²⁺ áramot emberi szíven, patkány myocardiumon viszont nem (Rivet-Bastide és mtsai, 1997). A PDE₂ gátlás hatását tengerimalac pitvari munkaizomsejteken még nem vizsgálták, a PDE₂ gátlás inotropiára gyakorolt befolyását pedig egy speciesen sem határozták meg. Célunk olyan kísérleti elrendezés kidolgozása volt, amelyben a PDE₂ inotrop hatása megítélhető, és eldönthető az is, hogy azt a tartós T₄ kezelés befolyásolja-e.

4. Az Ado metabolizmusának és kompartmentalizációjának érzékeny dinamikája következtében az [Ado]_{ISF}-t igen tág, három nagyságrendet felölelő intervallumban határozzák meg a jelenleg elfogadott mérőmódszerekkel (1. táblázat). Ezzel összhangban a mért [Ado]_{ISF}-változások is nagymértékben módszerfüggők (1. táblázat), ami megnehezíti az [Ado]_{ISF}-t változtató anyagok (pl. NT gátlók) hatásának kvantitatív elemzését. Célunk olyan módszer kidolgozása volt, amely alkalmas A₁ receptor agonisták koncentrációváltozásának megbízható becslésére a receptor mikro környezetében a Langmuir-Hill egyenletben rögzített összefüggés alapján. Ehhez E/A görbe felvételére van szükség a vizsgált szöveten. Az Ado-nal felvehető E/A görbék azonban erősen függenek a vizsgált szövet nukleozid transzportereinek és Ado-t metabolizáló enzimeinek funkcionális állapotától, mivel a görbe felvételéhez beadott Ado tetemes hányada eliminálódik, mire eléri a receptorát. A módszer kidolgozása során tehát szempont volt, hogy a módszer segítségével az A₁ receptor agonisták koncentrációváltozása a szövet hormonális státuszától függetlenül legyen megítélhető, ami által lehetőség nyílik a [Ado]_{ISF} változásainak összehasonlítására (pl. NT gátló hatására) az euthyreoid illetve hyperthyreoid szív között.

2. Anyagok és módszerek

2.1 Anyagok

A következő vegyületeket használtuk: adenosine (adenozin, Ado); 2'-deoxyadenosine (2'-deoxiadenozin, DAdo); 9- β -D-arabinofuranoside (9- β -D-arabinofuranosid, ARA-A); N⁶-cyclopentyladenosine (CPA); (R)-N⁶-(1-methyl-2-phenylethyl)adenosine (R-PIA); 2-chloroadenosine (ClAdo); 5'-(N-ethylcarboxamido)adenosine (NECA); acetyl- β -methylcholine chloride (metakolin, MC); ($\pm$)-verapamil hydrochloride (verapamil, VERA); *erythro*-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine hydrochloride (EHNA); S-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine (NBTI); cantharidin (kantaridin); cyclopiazonic acid (ciklopiazonsav); dipyridamole (dipyridamol, DP); coformycin (3- β -d-ribofuranosyl-6,7,8-trihydroimidazo 3,4-d 1,3 diazepin-8/R/-ol, CF); L-tiroxin Na sójának pentahidrátja (T₄). Valamennyi vegyszert a Sigma gyártotta, kivéve: a CF-t, amely Prof. H. Umezawa ajándéka volt (Institute of Microbial Chemistry, Tokyo, Japan); valamint a DAdo-t, melyet a Merck állított elő.

Az Ado-t 36 °C-os Krebs-Henseleit pufferben (Krebs oldat) oldottuk fel. A 10 mM CPA törzsoldatot etanol és víz 1:4 arányú oldatával készítettük, ezt Krebs oldattal hígítottuk tovább. Az EHNA-t és DP-t 96% etanolban, az NBTI-t, kantaridint és ciklopiazonsavat dimetil-szulfoxidban (DMSO), a CF-t desztillált vízben oldottuk. Az etanol illetve a DMSO koncentrációja nem haladta meg a szervkádiban a 0.2 V/V %-ot. A T₄ fiziológiás sóoldatban került felhasználásra, amely a T₄ előzetes, 3 M NaOH oldatban való feloldása miatt 0.01 m/V % NaOH-ot tartalmazott.

A preparátumok tápoldata minden esetben 36 °C-os módosított Krebs oldat volt, melyet a következő összetételben készítettünk (mM): NaCl: 118; KCl: 4.7; CaCl₂: 2.5; NaH₂PO₄: 1; MgCl₂: 1.2; NaHCO₃: 24.9; D-glükóz: 11.5; acidum ascorbicum: 0.1 (bidesztillált vízben oldva).

2.2 Állatok

Kísérleteinket 400-700 g testtömegű tengerimalacokból nyert bal pitvarokon végeztük. Az állatok tartása, előkezelése és feldolgozása összhangban volt a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottságának Etikai Kódexében megfogalmazottakkal.

2.2.1 Tiroxin kezelés

Azoknál a vizsgálatoknál, amelyeknél a cél az eu- és a hyperthyreoid állapot összehasonlítása volt, az állatokat random módon két csoportra osztottuk. A T₄ kezelt csoport tagjai 330 µg/testtömeg kg L-tiroxint (Na só, ·4H₂O) kaptak naponta egyszer intraperitoneálisan, míg az oldószeres (S) csoport állatai a T₄ oldószerét kapták ugyanolyan módon (*in vivo* kezelés). A kezelés 8 napig tartott, az állatok felhasználása a 9. napon történt. Az állatok thyreoid státuszának megítélése testtömegük és rectalis hőmérsékletük alapján történt. A T₄ kezelt állatok kiindulási testtömegük 17-28 %-át veszítették el, hőmérsékletük pedig 0.8-1.5 °C-ot emelkedett a 9. napra (szignifikáns változások). Az S kezelt csoportban a testtömeg és a hőmérséklet nem változott szignifikánsan.

2.2.2 *In vivo* elektrofiziológiai vizsgálat altatott állaton

A tengerimalacokat 30 mg/kg i.p. pentobarbitál narkózisban elektromosan szigetelt vizsgálópadra rögzítettük, majd az állatok végtagjain subcutan tűelektrodákat helyeztünk el. A standard végtagi elvezetéseket háromcsatornás, hőírós EKG készülékkel regisztráltuk.

2.2.3 A trijódttironin és tiroxin meghatározása

A thyreoid állapot verifikálása érdekében az állatok felhasználásakor nyert vérből centrifugálással szérummintákat készítettünk, amelyekből T₃ és T₄ meghatározás történt radioimmunoassay (RIA) módszerrel.

A T_3 illetve T_4 szérumkoncentrációja a T_4 kezelésű állatokon $3.1 (\pm 0.4)$ illetve >280 nM volt, míg az S kezelésű állatokon <0.38 illetve $32.7 (\pm 2.9)$ nM (szignifikáns különbségek), a T_4 kezelés tehát eredményes volt.

2.2.4 Adenozin dezamináz aktivitás meghatározása intakt myocardiumon

Rogler-Brown és mtsai (1978) intakt vörösvértestekre és Sarcoma 180 sejtekre kidolgozott metodikájának intakt myocardiumra kidolgozott módosításával (Szentmiklósi és mtsai, 1982) szöveti ADA aktivitást határoztunk meg a CF gátló hatásának megítélésére.

A kontroll pitvarokat Krebs oldatban, a CF kezelt pitvarokat pedig $8 \mu\text{M}$ CF-t tartalmazó Krebs oldatban inkubáltuk 50 percig (*in vitro* körülmények között a CF irreverzibilis ADA inhibitor). Ezután valamennyi pitvar tápoldatát 1 mM Ado-t tartalmazó Krebs oldatra cseréltük. 10 percig tartó expozíció után ezt az oldatot leöntöttük és ammóniatartalmát Kingsley és Tager (1970) módszerével határoztuk meg. A tápoldat 0.5 ml -ét összeráztuk 0.5 ml DOWEX AG 50 W-X4 gyantának ammóniamentes bidesztillált vízzel készített szuszpenziójával, majd 5 perc állás után dekantáltunk és a gyantát $3 \times 10 \text{ ml}$ desztillált vízzel mostuk. A vak érték meghatározásához normál Krebs oldatot használtunk, amelyet a próbával azonos kezelésnek vetettünk alá. A mosott gyantához 1.5 ml fenol reagenst (5 g kristályos fenol és 25 ml nitroprusszid nátrium 500 ml desztillált vízben oldva) és 1.5 ml alkalikus hipoklorit oldatot (4 ml 50 g/l koncentrációjú nátrium hipoklorit oldat 500 ml 0.125 M NaOH oldatban oldva) adtuk, majd 37°C -on 30 percig szervfürdőben inkubáltuk. A minták extinkcióját a vakkal történő nullázás után BECKMAN M2400 típusú spektrofotométeren 640 nm -nél olvastuk le. Az ammóniatartalmat standard ammóniumsulfát (141.5 g/100 ml desztillált víz) különböző koncentrációjával felvett referens görbe alapján számítottuk ki, majd az izmok nedves súlyának lemérése után meghatároztuk az 1 g szívizom által 1 perc alatt leadott ammónia mennyiségét. Agarwal (1980) alapján egységnyi aktivitásúnak tekintettük az ADA azon mennyiségét, amely $1 \mu\text{M}$ Ado-t 1 perc alatt bont ammóniává és inozinná. Esetünkben az aktivitásokat 1 g nedves súlyra vonatkoztattuk. Az ammónia felszabadulás legalább 20 percen keresztül lineárisnak bizonyult Ado jelenlétében.

A fenti mérést elvégeztük Ado-mentes tápoldatba helyezett pitvarokon is. A pitvarok az Ado-mentes pufferbe csak elhanyagolható mennyiségű ammóniát

adtak le (0.03 ± 0.02 E/g), amelyre az Ado jelenlétében meghatározott értékeket korrigáltuk.

2.2.5 Bal pitvari preparátumok készítése

A szívizom kontraktilitását a tengerimalacokból nyert bal pitvari preparátumokon végeztük. A tengerimalacokat éter narkózisban tarkócsapással bódítottuk, majd a mellkas feltárása után a szíveket gyorsan eltávolítottuk és szobahőmérsékletű Krebs oldatba helyeztük. A preparálókádban oxigenizált Krebs oldatban a bal pitvarokat leválasztottuk a környező szövetekről, végeikre kapillaritásmentes vékony fonalat rögzítettünk, majd a preparátumokat 10 mN feszítés mellett 10 cm^3 űrtartalmú, vertikális kiképzésű szervfürdő rendszerben (TSZ-04, Experimetria, Budapest) Krebs oldatban függesztettük fel, amelyet 95% O_2 és 5% CO_2 elegyével oxigenizáltuk, ezáltal az oldat pH-ja 7.4-re állt be. A preparátumok egyik végét plexihoroghoz, a másik végét izometriás mechano-elektromos átalakító (SG-01 D, Experimetria, Budapest) érzékelőjéhez rögzítettük.

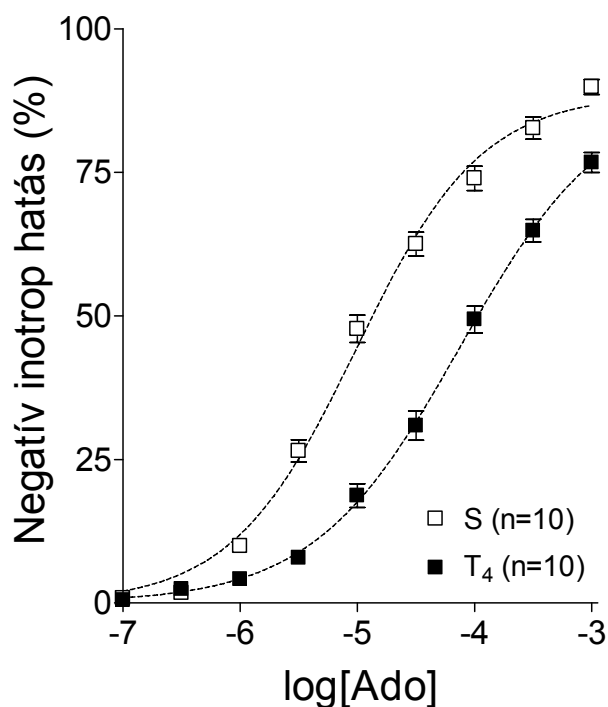
Az ingerlést pontszerűen kiképzett platina elektródokon keresztül programozható elektrostimulátorral (ST-02, Experimetria, Budapest) végeztük. Az ingerlési alapfrekvencia 3 Hz volt. Az ingerlést 1 ms impulzusszélesség mellett másfélszeres küszöbfeszültséggel végeztük. A kontrakciókkal arányos elektromos jeleket kétsugaras oszcilloszkóp (EMG-1555, Type TR-465, Budapest; EMG-1533, Type TR-4657, EMG, Budapest, EO 213, RFT, Dresden) bemeneteire vittük rá, illetve azokat 6 csatornás poligráfon (BR-61, Medicor, Budapest) rögzítettük. A preparátumokat 50 percen keresztül inkubáltuk normál Krebs oldatban, mialatt a kontraktilitási paraméterek stabilizálódtak. A vegyületek alkalmazása ebben az egyensúlyi állapotban történt. A $E/[A]$ görbék felvételét Van Rossum (1963) kumulatív módszere szerint végeztük. A vizsgálat során az izometrikus kontrakciókat regisztráltunk, melyeknek az amplitúdóját használtuk fel, mint kontrakciós erőt.

2.3 Protokollok

2.3.1 Az első E/[A] görbe

Az ingerlés megkezdésétől számítva 50 percig a pitvarok Krebs pufferben inkubálódtak. Inkubáció során (itt és minden más alkalommal is) a szervkádak oldatát 15-20 percenként cseréltük (mosás). Ezalatt a pitvarokat random módon az adott protokoll (ld.: *In vitro* kezelés és további E/[A] görbék) által megkívánt alcsoportok egyikébe soroltuk.

Ezután (stabil nyugalmi kontrakciós erő esetén) Ado-nal kumulatív E/[A] görbét vettünk fel valamennyi alcsoportban. A hatás beálltát az adott dózis beadása után kialakuló legkisebb kontrakciós erő jelezte (3. ábra).



3. ábra. Oldószerkezelt (S) és tiroxinkezelt (T₄) tengerimalacokból származó bal pitvarok tipikus Ado E/[A] görbéi. Az x tengelyen az Ado koncentrációjának tízes alapú logaritmusát tüntettük fel, míg az y tengelyen a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenését (ld.: 2.4 Adatfeldolgozás). A szimbólumok átlagolt válaszokat mutatnak (számtani közép ± SEM). A válaszokra a Langmuir-Hill egyenletet (ld.: Adatfeldolgozás) illesztettük (szaggatott vonal).

Az első E/[A] görbe kétféleképpen kerülhetett felhasználásra attól függően, hogy a második E/[A] görbe milyen agonistával lett felvéve. Ha Ado-nal, akkor az első annak kontroll görbéje volt (önkontrollos kísérlet), ha CPA-val, metakolinnal (MC) vagy verapamillal (VERA), akkor csak az adatfeldolgozásba való beválasztási kritériumok teljesülését ítéltük meg a rajta, illetve a preparátumok

„edzését” szolgálta. Ilyenkor külön kontroll alcsoport szolgáltatatta a kontroll adatokat az *in vitro* kezelés hatásának megítéléséhez.

2.3.2 *In vitro* kezelés és további E/[A] görbék

Az első E/[A] görbe felvételét követő mosás után 50 perces inkubációkat (*in vitro* kezelés) alkalmaztunk. Ezután a lentebb feltüntetett anyagok megadott koncentrációival egy második E/[A] görbét vettünk fel, néhány vizsgálatban ezt mosás és újabb *in vitro* kezelés + harmadik E/[A] görbe követte. A kiértékelések során az első és a második E/[A] görbe kiindulási kontrakciós erejét, továbbá a E/[A] görbék adatait használtuk fel.

Az adenozerin szignalizáció extra- és intracelluláris komponensének elkülönítését célzó kísérleteinkben egy sor inkubálószer és agonistát használtunk, az egyes alcsoportokba kezeletlen, S vagy T₄ kezelt állatok tartoztak (4-10 db). A 3.2 alfejezetben az eredmények ismertetése során minden szükséges információra kitérünk.

A NT és az ADA gátlásán alapuló vizsgálatainkban (3.3 alfejezet) a lentebb felsorolt 7 *in vitro* kezelést alkalmaztuk. Mivel ezek után a második (illetve harmadik) E/[A] görbe is Ado-nal készült, az Ado gyors eliminációja (könnyű kimosni) önkontrollos kísérletek végzésére nyújtott lehetőséget. Az *in vitro* kezelést S és T₄ *in vivo* kezelésű pitvarok kapták, a kétféle kezelés 12 alcsoportot eredményezett (mivel a 6. és 7. kezelés az 5-et követte):

1. DP (3 µM); Ado E/[A] görbe
2. NBTI (1 µM); Ado E/[A] görbe
3. CF (8 µM); Ado E/[A] görbe
4. kantaridin (0.5 µM); Ado E/[A] görbe
5. EHNA (10 µM); Ado E/[A] görbe; az ide tartozó négy alcsoportban mosás után a 6. vagy a 7. protokoll szerint még egy *in vitro* kezelést és egy harmadik E/[A] görbét is kivitelezünk:
6. kantaridin (0.5 µM) + EHNA (10 µM); Ado E/[A] görbe
7. ciklopiazonsav (20 µM) + EHNA (10 µM); Ado E/[A] görbe.

A PDE₂ gátlás hatását vizsgáló kísérletekben (3.4 alfejezet) 3 *in vitro* kezelést végeztünk S és T₄ *in vivo* kezelésű állatok pitvarain, ami 6 alcsoportot adott a kétféle kezelés kombinációjaként:

1. Ø; CPA E/[A] görbe (kontroll alcsoportok)
2. EHNA (10 µM); CPA E/[A] görbe
3. NBTI (10 µM); CPA E/[A] görbe.

Azokban a kísérletekben, ahol a vizsgálat célja a koncentrációbecslésre kifejlesztett függvény tesztelése volt (3.5 alfejezet), a lenti 6 *in vitro* kezelést alkalmaztuk *in vivo* kezelés nélküli állatok pitvarán. Ez 9 alcsoportot eredményezett (eltérő ágenssel felvett E/[A] görbe külön alcsoportot jelent):

1. Ø; CPA vagy MC vagy VERA E/[A] görbe (3 kontroll alcsoport)
2. CPA (3 nM); CPA E/[A] görbe
3. CPA (30 nM); CPA E/[A] görbe
4. CPA (100 nM); CPA vagy MC E/[A] görbe (2 alcsoport)
5. MC (200 nM); MC E/[A] görbe
6. VERA (300 nM); VERA E/[A] görbe.

2.4 Adatfeldolgozás

2.4.1 Beválasztási kritériumok

A pitvaroknak 3 feltételt kellett teljesíteniük az elsőként kivitelezett Ado E/[A] görbe alapján ahhoz, hogy bekerüljenek az elemzésbe.

1. A nyugalmi kontrakciós erő elérte az 1 mN-t az első E/[A] görbe előtt.
2. A pitvarok mechanikai aktivitása szabályos volt (nem volt arrhythmia).
3. Az EC₅₀-hez legközelebbi Ado koncentrációra adott válasz belül volt a számtani közép ± 2 SD intervallumon. A számtani közepet és a SD-t az első két feltételt teljesítő pitvarokra határoztuk meg, az eltérő thyreoid státuszú preparátumokra külön. Az *in vivo* kezeletlen illetve S kezelt pitvarok esetében ez az Ado koncentráció 10 µM volt, a T₄ kezeltéknél pedig 100 µM.

Valamennyi pitvar adatait felhasználtuk, amelyek teljesítette a 3 beválasztási kritériumot.

2.4.2 A kontrakciós erők feldolgozása

Egy preparátum intakt kontrakciós erejét első $E/[A]$ görbéjének kiindulási kontrakciós erejeként határoztuk meg. Az *in vitro* kezelés hatására kialakult kontrakciós erőt az intakt kontrakciós erő százalékában fejeztük ki a kezeléshez használt szer inotrop hatásának jellemzésére.

2.4.3 A koncentráció-hatás görbék feldolgozása

Egy c agonistakoncentráció hatásának (E) a kiindulási kontrakciós erő (F_0) százalékos csökkenését tekintettük (F_c a kialakuló legkisebb kontrakciós erő c jelenlétében):

$$E = \frac{F_0 - F_c}{F_0} \cdot 100\%$$

A $E/[A]$ görbe pontjaira a Langmuir-Hill egyenletet illesztettük:

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

ahol: c az agonista koncentrációja; E a hatás c -nél; $E_{\max}$ az adott agonistával kiváltható maximális hatás; EC_{50} a félhatásos koncentráció, ennek reciproka a hatékonyság („potency”), negatív 10-es alapú logaritmusa ($-\lg EC_{50}$) pedig a pD_2 ; n_H a Hill koefficiens („slope”).

Az egyes preparátumok válaszkészségét az agonistával szemben $E/[A]$ görbék $E_{\max}$, EC_{50} és n_H paramétereivel jellemeztük, ezeket a paramétereket használtuk fel később a statisztikai elemzéshez és a „koncentráció-meghatározó” egyenlethez (ld.: Eredmények).

2.4.4 Statisztikai feldolgozás

Normál eloszlást és homogén variánciákat mutató két csoport esetén kétoldali kétmintás Student-féle t tesztet (önkontrollos esetben párosítottat, egyébként párosítatlant) készítettünk, kettőnél több csoportra egyutas varianciaanalízist (ANOVA) végeztünk, melyet Newman-Keuls poszt-teszt követett. Ha két normál eloszlású csoport variánciái különbözőek voltak, Welch-korrigált t tesztet használtunk. Nem normál eloszlást mutató két csoportot Mann-Whitney U tesztel, többet Kruskal-Wallis tesztel hasonlítottunk össze, utóbbit Dunn poszt-tesztel kiegészítve. Az *in vivo* és az *in vitro* kezelés interakcióját kétutas ANOVA-val vizsgáltuk. A „koncentráció-meghatározó” egyenlet illesztésével kapott koncentrációbecsléseket, ha azok normál eloszlást mutattak, egymintás Student-féle t tesztel hasonlítottuk össze az általunk bemért (ismert) koncentrációkkal, nem normál eloszlás esetén pedig Wilcoxon tesztel. A véletlen oki szerepét $p < 0.05$ esetén vetettük el.

3. Eredmények

3.1 A biológiai paraméterek változása az *in vivo* és *in vitro* kezelések során

3.1.1 A thyreoid status

Az S kezelt csoportban a testtömeg és a rektális hőmérséklet nem változott szignifikánsan. A T₄ kezelt csoportban a testtömeg 24 %-al csökkent, a rektális hőmérséklet másfél fokkal emelkedett, a szívfrekvencia 31 %-al nőtt és jelentősen emelkedett a szérumban T₃ és T₄ szint. A bal pitvar/testtömeg arány is jelentősen nőtt a T₄ kezelés következtében (2. táblázat).

Paraméter	Egység	S kezelt	T ₄ -kezelt
Testtömeg	g	583 ± 24	442 ± 23 *
Rektális hőmérséklet	°C	37.9 ± 0.2	39.4 ± 0.1 *
Szívfrekvencia	min ⁻¹	202 ± 14	264 ± 12 *
Szérumban T ₄ koncentráció	nM/l	32.7 ± 2.9	> 280 *
Szérumban T ₃ koncentráció	nM/l	< 0,38	3.1 ± 0.4 *
Bal pitvar/testtömeg	mg/g	0.065 ± 0.04	0.105 ± 0.02 *
n		10	9

2. táblázat. A biokémiai, anyagcsere és hemodinamikai paraméterek változása kontroll és T₄ kezelt tengerimalacokon. * szignifikáns eltérés a kontrolltól.

3.1.2 Az adenosin dezamináz aktivitásának változása coformycin jelenlétében

A metodikában ismertetett módszer felhasználásával meghatároztuk intakt tengerimalac pitvarszövet ADA aktivitását. A kontroll pitvarok ADA aktivitása 0,21 ± 0,02 E/g-nak bizonyult (n = 7). A kísérleteinkben alkalmazott 8 µM coformycin 93 ± 5%-al gátolta az enzim aktivitását.

3.2 A tiroxin kezelés hatása az adenzin receptor agonisták és a P-site aktivátorok negatív inotrop effektusára

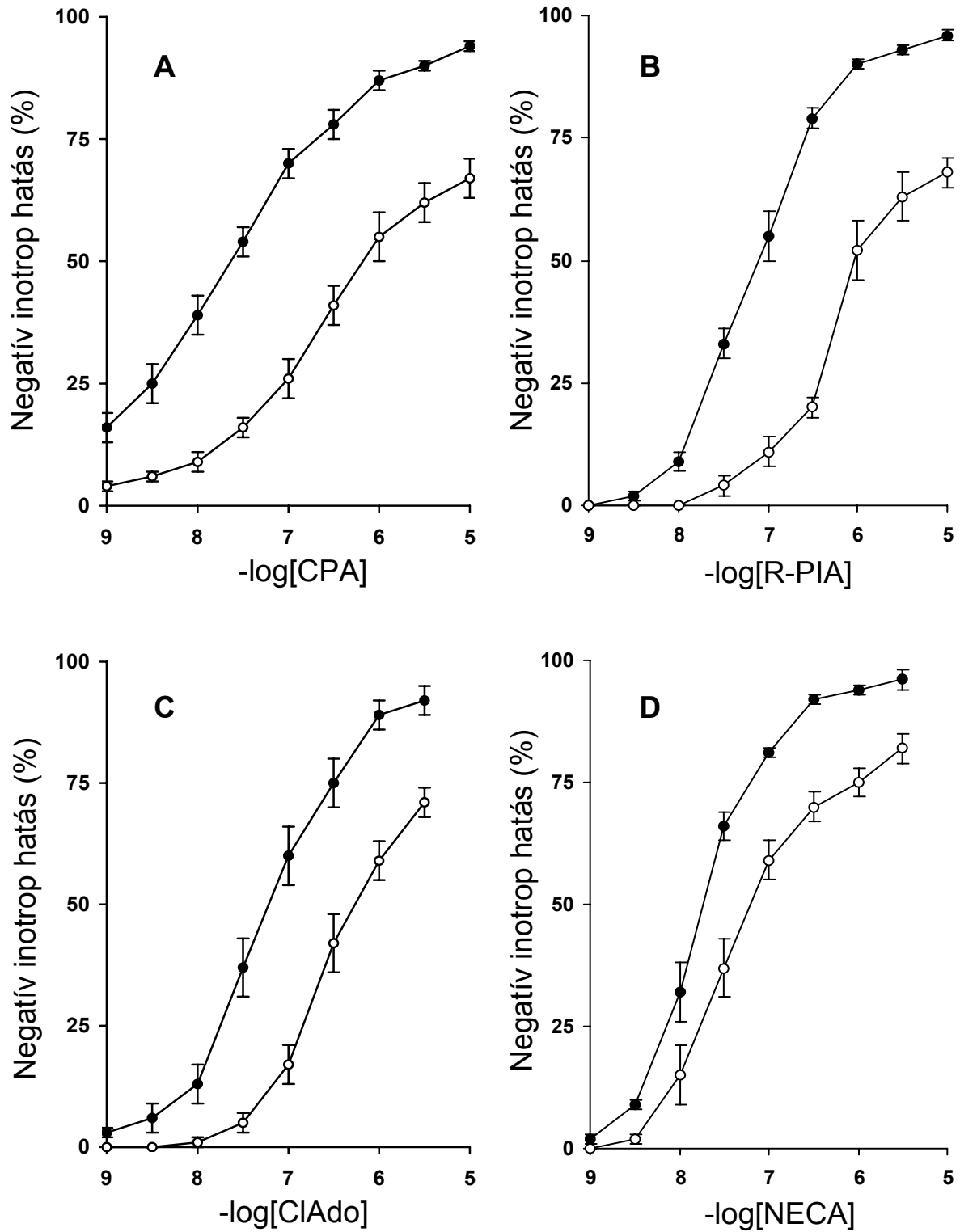
3.2.1 Az adenzin és az extracelluláris támadáspontú adenzin receptor agonisták myocardialis hatásának változása

Az S és a T₄ kezelt tengerimalacokból származó, elektromosan ingerelt (3 Hz, 1 ms, másfélszeres küszöb feszültség) pitvarokon az Ado (0.01 μ M - 1mM) koncentráció-függő módon, de differenciáltan csökkentette az izometriás kontrakciós erőt (5. ábra). Megfigyelhető, hogy míg az S kezelt Ado E/[A] görbék pD₂ értéke 4.94 ± 0.09 (n = 26) volt, addig a T₄ kezelés után ez az érték 4.08 ± 0.08 -ra csökkent (p < 0.01), jelezve az agonista hatékonyságának mintegy 8-szoros csökkenését. T₄ hatására a maximális válasz (E_{max}) is csökkent.

Hasonló jelenséget figyeltünk meg az A₁ receptorok specifikus agonistáival, a CPA-val és az R-PIA-val is, amikor erőteljes hatásgyengülés volt tapasztalható T₄ kezelés után. A CPA-ra és az R-PIA-ra vonatkozó kontroll pD₂ értékek 7.74 ± 0.09 illetve 7.14 ± 0.08 , míg a T₄ kezelt pitvarokon mért értékeket 6.75 ± 0.11 illetve 6.25 ± 0.19 voltak. A hatékonyság csökkenése tehát mintegy 10 illetve 8-szoros volt (p < 0.01). A pD₂ értékek csökkenését jelentős mértékű E_{max} depresszió is kísérte (4. ábra A, B).

A kevésbé specifikus A₁ receptor agonista ClAdo (kiszokú A₂ receptor agonista hatás) esetében a kontroll pD₂ 7.17 ± 0.16 volt, míg 8 napos T₄ kezelés után ez 6.29 ± 0.16 -ra módosult (p < 0.01). A hatékonyság csökkenése 8-szoros. Az E_{max} szintén csökkent (4. ábra C).

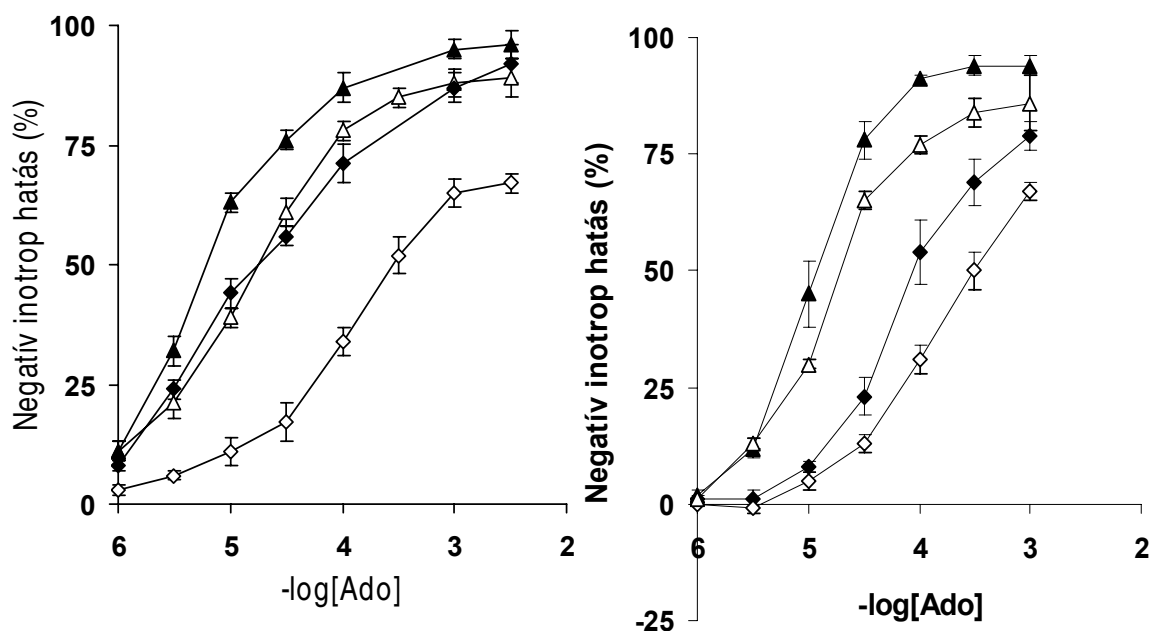
Érdekes módon, az A₁ és az A₂ receptorokat közel hasonló mértékben aktiváló NECA esetén a T₄ hatására az előbbiekhöz képest kisebb eltolódás alakult ki az E/[A] görbékben. Az S kezelt pitvarokon a NECA-ra vonatkozó pD₂ érték 7.72 ± 0.07 , míg a T₄ kezeltre számított pD₂ érték 7.26 ± 0.18 volt. A hatékonyság csökkenése csak 3-szoros (p < 0.05). Az E_{max} redukciója viszont itt is kifejezett. (4. ábra D).



4. ábra. A CPA-ra (A), R-PIA-ra (B), CIAdo-ra (C) és a NECA-ra (D) adott negatív inotrop válasz módosulása T₄ kezelés hatására tengerimalac bal pitvarokon (számtani közép ± SEM). Az x tengelyen az Ado receptor agonista koncentrációjának negatív tízes alapú logaritmusát vettük fel, az y tengelyen pedig a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenését. A sötét szimbólumok *in vivo* S, a világos szimbólumok pedig *in vivo* T₄ kezelést jeleznek.

Kísérleteket végeztünk két tipikus P-site agonistával, a 2'-deoxiadenozinnal (DAdo) és a 9-β-D-arabinofuranosiddal (ARA-A), amelyek szelektíve aktiválják az adenilcikláz intracelluláris felszínére lokalizálódó P-site-ot. A DAdo és az ARA-A a többi vizsgált agonistához képest gyengébb hatású és rosszabb oldékonyságú, ezért a teljes szigmoid E/[A] görbét nem lehetett velük felvenni. Ennek megfelelően pD_2 és E_{max} helyett az összehasonlítás alapját DAdo és ARA-A E/[A] görbék esetében az EC_{25} alapján történő értékelés képezte.

Az Ado hatását az S kezelt pitvarokon a CF csak kismértékben potenciálta, a számított pD_2 értékek alapján az Ado hatékonysága mintegy 2-szeresére nőtt. A T_4 kezelt pitvarokon viszont CF jelenlétében az Ado hatékonysága nagymértékben fokozódott, megközelítőleg 10-szeresére (5. ábra A).



5. ábra. Az Ado-ra adott negatív inotrop válasz 8-PT hiányában (A) és folyamatos jelenlétében (B) tengerimalac bal pitvarokon (számtani közép $\pm$ SEM). Az x tengelyen az Ado koncentrációjának negatív tízes alapú logaritmusát vettük fel, az y tengelyen a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenését. A rombusz szimbólumok az ADA intakt állapotát jelzik, a háromszögek pedig 8 μ M CF hozzáadását a rendszerhez. A sötét szimbólumok *in vivo* S, a világos szimbólumok pedig *in vivo* T_4 kezelést jelentenek.

Az előbbi kísérleteket 10 μ M 8-PT folyamatos jelenlétében is elvégeztünk. Az S kezelt pitvarokon a CF kb. 7-szeresére fokozta az Ado hatékonyságát, míg a T_4 kezelt pitvarokon 16-szorosára (5. ábra B).

3.2.2 A P-site aktivátorok hatásának változása

A P-site hatás kritériumok teljesülésének vizsgálata

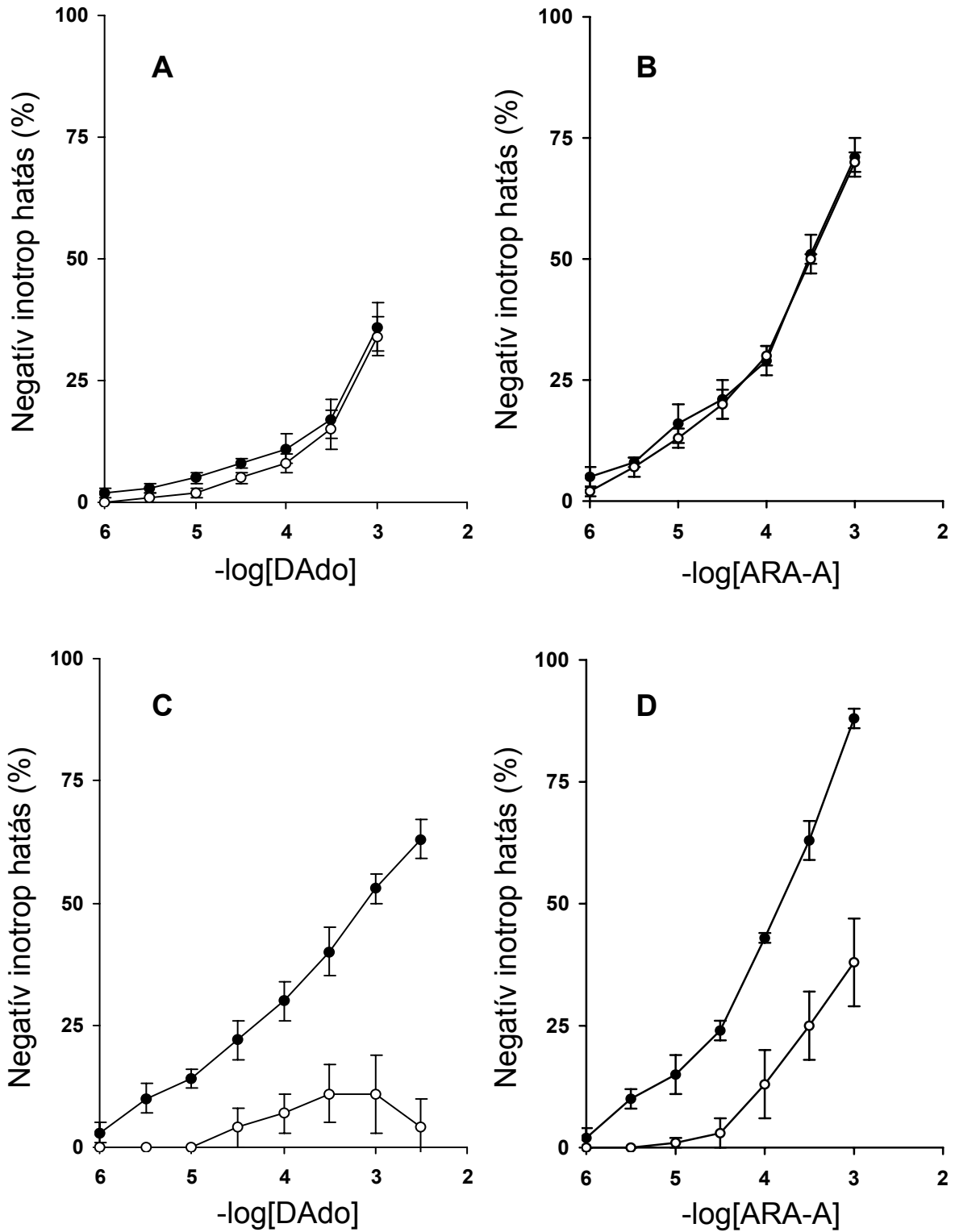
A P-site hatás 3 alapvető kritériumát vizsgáltuk: (1.) A metilxantin rezisztenciát, (2.) A hatásnak az adenilcikláz aktiválás általi fokozhatóságát, (3.) Az intracelluláris támadáspont tényét.

Ad 1.: A DAdo és a ARA-A negatív inotrop hatását 10 μ M 8-PT (A_1 és A_2 Ado receptor blokkoló) jelenléte gyakorlatilag nem befolyásolja (6. ábra A, B).

Ad 2.: Az adenilcikláz 20 μ M forskolinnal történt aktiválása után mind a DAdo, mind az ARA-A hatása jelentősen fokozódott (adatokat nem tüntettünk fel).

Ad 3.: 10 μ M NBTI (ENT1 blokkoló) mindkét purin analóg hatását szignifikánsan csökkentette (6. ábra C, D). Ebben a kísérletsorozatban a P-site agonisták hatását ADA gátló adásával potencíroztuk NBTI hiányában és jelenlétében is.

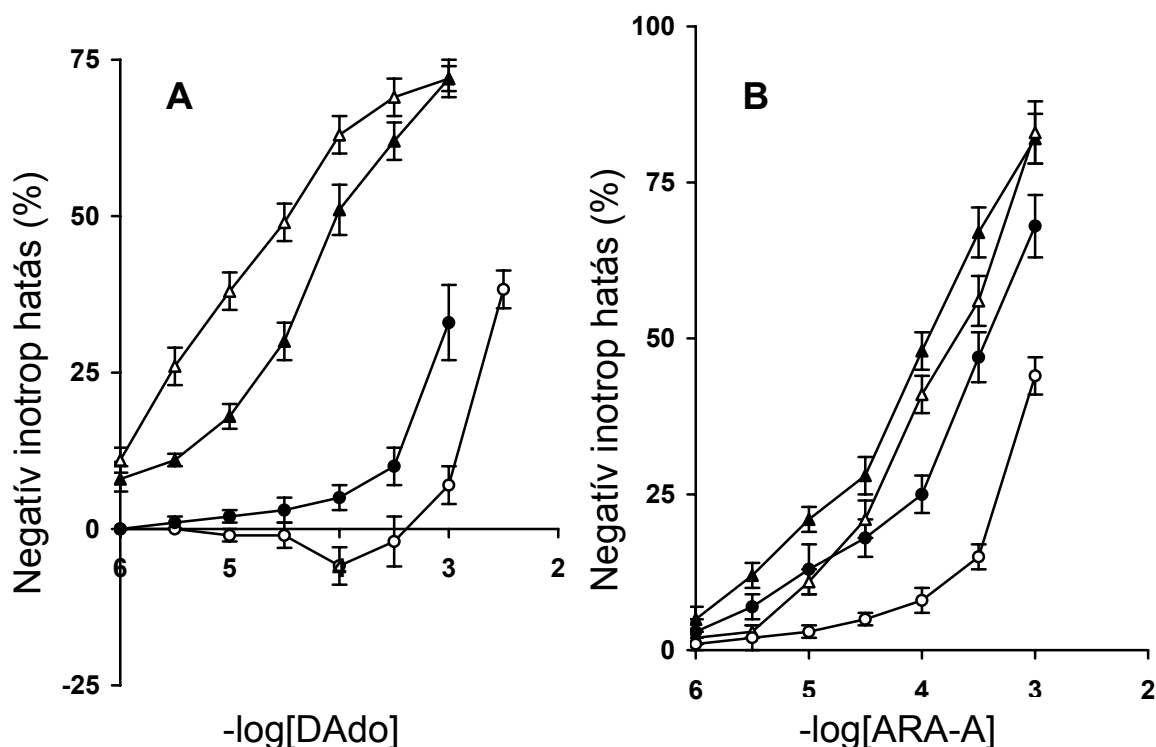
DAdo és az ARA-A által létrehozott negatív inotropia tehát döntően nem sejtfelszíni Ado receptoron, hanem feltehetően P-site aktiváción keresztül mediálódik.



6. ábra. A DAdo-ra (**A**, **C**) és az ARA-A-ra (**B**, **D**) adott negatív inotrop válasz euthyreoid tengerimalac bal pitvarokon (számtani közép $\pm$ SEM). Az x tengelyen a P-site aktivátor szintjének negatív tízes alapú logaritmusa ábrázoltuk, az y tengelyen pedig a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenését. Az **A** és **B** panelen a sötét szimbólumok 8-PT hiányát, a világosak pedig 8-PT jelenlétét mutatják, míg a **C** és **D** panelen a sötét szimbólumok NBTI hiányát, a világosak pedig NBTI jelenlétét jelzik. A **C** és **D** panel E/[A] görbéi mind 8 μ M CF jelenlétében készültek.

A tiroxin kezelés effektusa a P-site agonisták hatására

A DAdo hatását a T₄ kezelés nemcsak csökkentette, mint az Ado és az extracelluláris támadáspontú Ado receptor agonisták esetében, hanem meg is fordította, azaz enyhe pozitív inotropiát tapasztaltunk (7. ábra A). A DAdo hatását jellemző -logEC₂₅ euthyreoid pitvarokon 3.05 ± 0.12 volt, a hyperthyreoid pitvarokon ez 2.60 ± 0.09 -re csökkent. Ehhez hasonlóan a ARA-A hatása is mintegy harmadrészére gyengült a T₄ kezelés következtében (7. ábra B).



7. ábra. A DAdo (A) és az ARA-A (B) negatív inotrop hatásának változása T₄ kezelésre tengerimalac bal pitvaron (számtani közép $\pm$ SEM). Az x tengelyen a DAdo illetve az ARA-A koncentrációjának negatív tízes alapú logaritmusát vettük fel, az y tengelyen a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenését. A rombusz szimbólumok jelzik az ADA intakt állapotát, míg a háromszögek 8 μ M CF jelenlétét. A sötét szimbólumok S, a világosak T₄ kezelést mutatnak.

Az adenzin dezamináz gátlás befolyása a P-site aktivátorok myocardialis hatására

Az intracelluláris P-site aktivátorok hatásának ez a jelentős csökkenése felvetette azt a lehetőséget, hogy az Ado hatás csökkenésében az extracelluláris hatások háttérbe szorulása mellett az intracelluláris komponensek szerepének

dominanciája játszhat lényeges szerepet. További vizsgálataink azt mutatták, hogy 8 μM CF közel maximálisan gátolja az ADA aktivitását. A 8. D ábrán látható, hogy a CF az Ado hatását kismértékben potenciálja. A számított pD_2 értékek alapján a potenciálás mértéke tehát mintegy kétszeres.

A T_4 kezelt tengerimalacokból származó pitvarokon a gyengült Ado hatás nagymértékben fokozódott CF jelenlétében. A pD_2 értékek alapján számolt potenciáló hatás mértéke mintegy 10-szeres (8. ábra D).

Az extracelluláris AR receptor hatások kizárása céljából kísérleteket végeztünk 10 μM 8-PT jelenlétében is. Ilyen körülmények között az S kezelt pitvarokon a CF mintegy 7-szeresére fokozta az Ado hatékonyságát, szemben a 8-PT jelenléte nélküli kétszeressel. A T_4 kezelt pitvarokon a CF 16-szorosára növelte az Ado hatékonyságát 8-PT mellett, szemben a 8-PT jelenléte nélküli 10-szeres hatásfokozódással (5. ábra B). Amennyiben tehát az Ado hatásának extracelluláris komponensét 8-PT-vel redukáljuk, a CF fokozott mértékben potenciózta a hatás megmaradt komponensét.

Míg elektromosan ingerelt, oldószerral kezelt pitvarkészítményeken a DAdo mérsékelt negatív inotrop hatást produkált, az ADA CF-el történő bénítása után a hatás jelentősen, mintegy 24-szeresére fokozódott (7. ábra A).

A 8 napos T_4 kezelt tengerimalacok pitvarán 8 μM CF meglepően intenzív, 765-szörös fokozódást eredményezett a DAdo hatásában (7. ábra A).

Tendenciáját tekintve hasonló eredményeket értünk el ARA-A-val, a másik P-site agonistával is. Itt kontroll preparátumokon 3-szoros, míg T_4 kezelt pitvaron 12-szeres hatásfokozódást tapasztaltunk a számított EC_{25} értékek alapján (7. ábra B).

A két P-site agonista hatásának befolyásolhatósága szempontjából a potenciálás jellege azonos volt akkor is, ha a CF helyett egy másik, nem-specifikus ADA gátló szert, EHNA-t (10 μM) használtuk (adatokat nem közöltünk).

3.3 A tiroxin kezelés befolyása a nukleozid transzport gátlók és az adenozin dezamináz gátlók hatására

A NT blokkoló DP (3 μM) és NBTI (1 μM), továbbá az ADA gátló EHNA (10 μM) és CF (8 μM) egyaránt potenciózták az Ado hatását mind az S, mind a T_4 kezelt pitvarokon. Az NT gátlók jelentős EC_{50} csökkenést produkáltak (amit a $\text{E}/[\text{A}]$ görbe nagyfokú balra tolódása jelez), az E_{max} -ot viszont alig befolyásolták. Ezzel szemben az ADA inhibitorok, ha kisebb mértékben is, de szignifikánsan csökkentették EC_{50} -et, ugyanakkor jelentősen növelték az E_{max} -ot (3. táblázat; 8. ábra).

A NT blokkolók esetében az első (*in vitro* kezelés előtti) és a második (*in vitro* kezelés utáni) Ado $\text{E}/[\text{A}]$ görbe EC_{50} -ének hányadosa („potency” arány) nem különbözött szignifikánsan az eu- és a hyperthyreoid pitvarok között. Ezzel szemben, ADA gátló kezelés esetében a hyperthyreoid pitvarok „potency” aránya szignifikánsan nagyobb volt, mint az euthyreoidoké (4. táblázat).

A foszfatáz (PP1 és PP2A típus) gátló kantaridin (0.5 μM) a szignifikancia-szintet el nem érő kisfokú csökkenést hozott létre az Ado hatásában. ADA gátló EHNA jelenlétében ez a csökkenés statisztikailag szignifikánssá vált. A kantaridin és az EHNA együtt lényegesen nagyobb mértékben gátolta az Ado hatását a T_4 kezelt preparátumokon, mint az S kezeltéken (9. ábra).

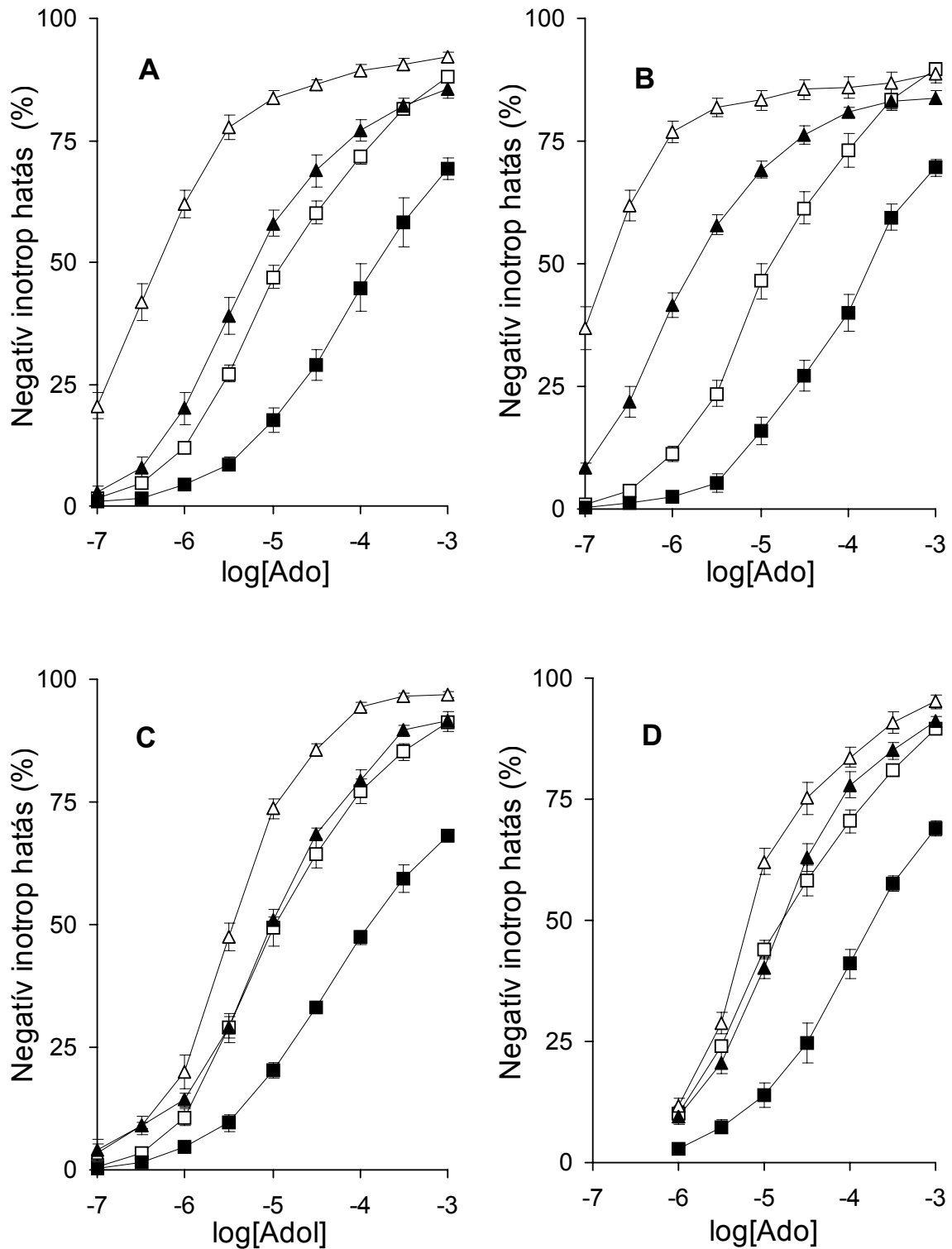
A SERCA gátló ciklopiazonsav (20 μM) viszont az EHNA jelenléte ellenére sem befolyásolta az Ado $\text{E}/[\text{A}]$ görbe lefutását (9. ábra).

Inhibitor	S kezelt		T ₄ kezelt	
	Az inhibitor beadása			
	előtt	után	előtt	után
DP				
E _{max}	89 ± 1	90 ± 1	75 ± 7 ^a	84 ± 2
pD ₂	4.96 ± 0.07	6.45 ± 0.08 ^b	4.08 ± 0.21 ^a	5.37 ± 0.12 ^b
n	9	9	5	5
NBTI				
E _{max}	91 ± 1	87 ± 2	82 ± 1 ^a	83 ± 1
pD ₂	5.03 ± 0.07	6.94 ± 0.1 ^b	4.09 ± 0.12 ^a	5.96 ± 0.13 ^b
n	5	5	5	5
EHNA				
E _{max}	89 ± 2	96 ± 2 ^b	75 ± 2 ^a	95 ± 4 ^b
pD ₂	4.91 ± 0.07	5.48 ± 0.06 ^b	4.35 ± 0.04 ^a	5.07 ± 0.03 ^b
n	6	6	3	3
CF				
E _{max}	91 ± 1	93 ± 2	82 ± 4 ^a	93 ± 1 ^b
pD ₂	4.88 ± 0.15	5.22 ± 0.04 ^b	3.89 ± 0.06 ^a	4.87 ± 0.06 ^b
n	6	6	5	5

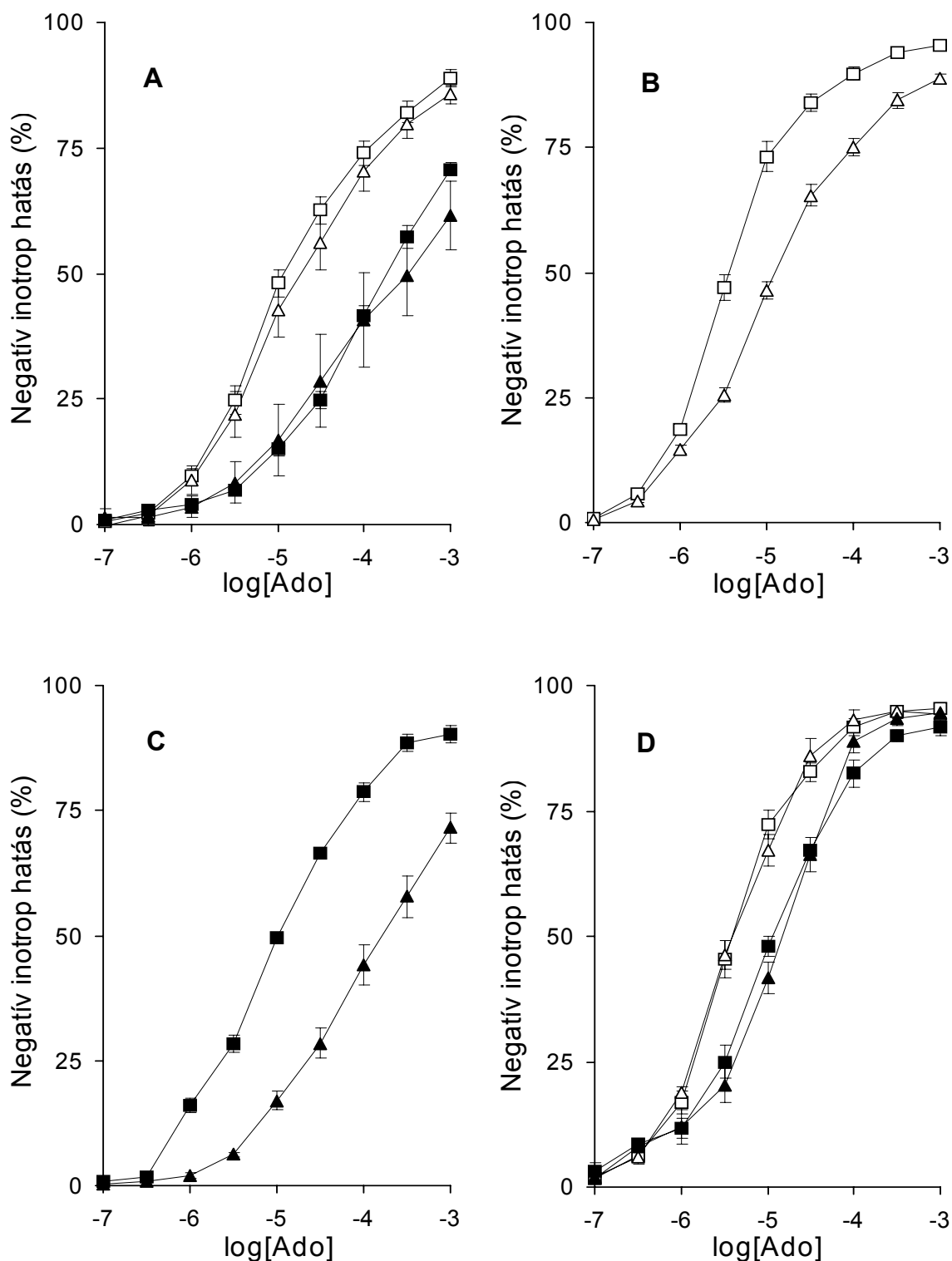
3. táblázat. A NT és az ADA inhibitorainak hatása Ado E/[A] görbék paramétereire oldószer (S) illetve tiroxin (T₄) kezelt tengerimalacok izolált bal pitvarán (számtani közép ± SEM). ^a P < 0.05 a megfelelő S kezelésű értékkel való összehasonlításban (az inhibitor beadása előtt); ^b P < 0.05 az inhibitor beadása előtti önkontrollal összehasonlítva.

	S kezelt pitvarok	T ₄ kezelt pitvarok
DP	39 (±11)	40 (±17)
NBTI	87 (±15)	76 (±7)
EHNA	3 (±0.4)	5 (±0.4) *
CF	2 (±0.2)	10 (±1.5) *

4. táblázat. *In vivo* S és T₄ kezelt pitvarokon az *in vitro* kezelés előtt és után felvett Ado E/[A] görbék „potency” aránya. „Potency” arány = EC_{50(előtt)}/EC_{50(után)} = potency_(után)/potency_(előtt). Az S és T₄ kezelt alcsoportok közötti különbség szignifikancia-szintjét a T₄ kezelt pitvaroknál jelöltük.



8. ábra. Az Ado-ra adott negatív inotrop válasz módosulása *in vitro* DP (A), NBTI (B), EHNA (C) és CF (D) kezelés hatására tengerimalac pitvarokon. Az x tengelyen az Ado koncentráció tízes alapú logaritmusát vettük fel, az y tengelyen pedig a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenését. A világos szimbólumok *in vivo* S, a sötét szimbólumok pedig *in vivo* T₄ kezelést jeleznek. A négyzetek az első, kontroll Ado E/[A] görbét mutatják, a háromszögek a fentebb részletezett anyagok jelenlétében felvett második Ado E/[A] görbét (számítási közép ± SEM).



9. ábra. Az Ado-ra adott negatív inotrop válasz módosulása kantaridin (**A**, **B**, **C**) és ciklopiazonsav (**D**) hatására a pitvarokon. Az x tengelyen az Ado-szint tízes alapú logaritmusát vettük fel, az y tengelyen pedig a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenését. A világos szimbólumok *in vivo* oldószerekkel, a sötét szimbólumok *in vivo* tiroxin kezelést jeleznek. A négyzetek a kantaridin illetve a ciklopiazonsav hiányát, a háromszögek pedig jelenlétét mutatják (számtani közép $\pm$ SEM). A **B**, **C** és **D** paneleken mutatott $E/[A]$ görbénél EHNA minden esetben jelen volt.

3.4 A tiroxin kezelés befolyása a cGMP-stimulált 3',5'-ciklikus nukleotid foszfodiészteráz (PDE₂) gátlásának hatására

Az NBTI és az EHNA szignifikánsan csökkentette mind az eu-, mind a

hyperthyreoid pitvarok kontrakciós

erejét. Az NBTI által okozott csökkenés

hasonló mértékű volt a thyreoid

státusztól függetlenül. EHNA esetében

a negatív inotrop hatás mérsékeltebb

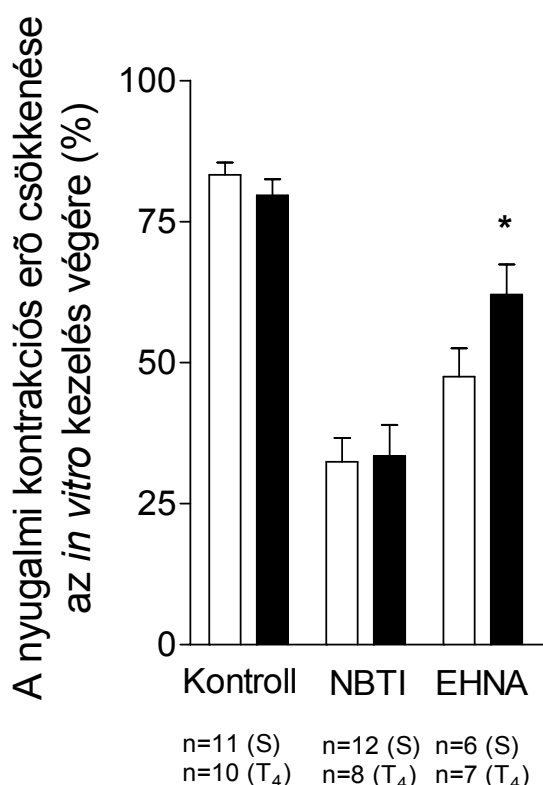
volt, mint az NBTI kapcsán tapasztalt, a

hyperthyreoid preparátumok pedig

jobban megőrizték kiindulási

kontrakciós erejüket, mint az

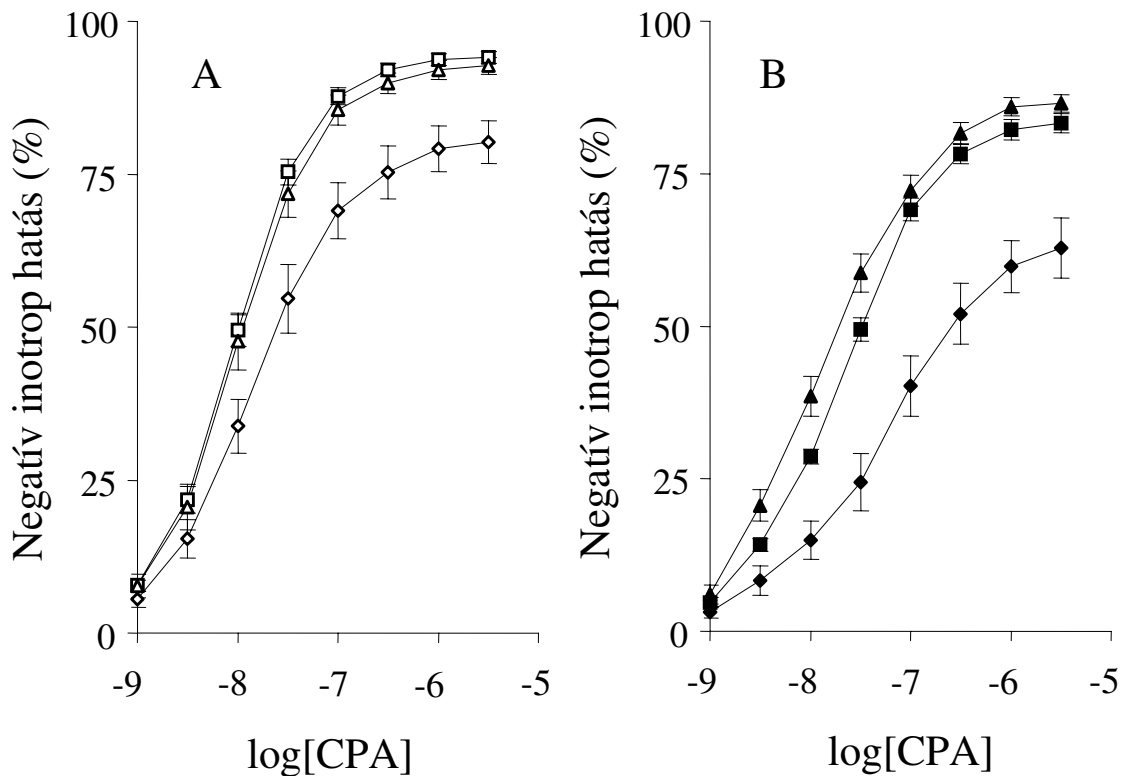
euthyreoidok (10. ábra).



10. ábra. Az *in vitro* kezelés hatása *in vivo* S (világos oszlop) és T₄ (sötét oszlop) kezelésű bal pitvarok kontrakciós erejére (+ SEM). Az azonos *in vitro* kezelésű alcsoportok közötti különbségek szignifikancia-szintje fel van tüntetve.

A CPA negatív inotrop hatékonyságát a T₄ kezelés szignifikánsan csökkentette (a hyperthyreoid kontroll CPA E/[A] görbe E_{max}-a kisebb, EC₅₀-e pedig nagyobb volt, mint az euthyreoid kontroll CPA E/[A] görbe megfelelő paraméterei). Az NBTI-vel való inkubáció szintén szignifikánsan csökkentette a CPA-ra adott választ mind az S, mind a T₄ kezelt csoporton belül. Az euthyreoid pitvarokon a CPA hatása a kontroll és az EHNA kezelt alcsoportokban alig különbözött egymástól, a hyperthyreoid pitvarokon viszont az EHNA kezelés szignifikánsan fokozta a CPA hatását a kontroll alcsoportéhoz képest (11. ábra).

Az EC₅₀ szintjén szignifikáns interakció mutatkozott az EHNA és a T₄ kezelés között, mutatván, hogy hatásaik különleges módon összegződnek a pitvarokon.



11. ábra. Az *in vitro* kezelés hatása S (A; világos szimbólumok) és T₄ (B; sötét szimbólumok) kezelt bal pitvarok CPA-val szembeni érzékenységre. Az x tengelyen a CPA koncentráció tízes alapú logaritmusát tüntettük fel, az y tengelyen pedig a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenését. A négyzetek mutatják a kontroll alcsoportokat, a rombuszok az NBTI kezelt, a háromszögek pedig az EHNA kezelt alcsoportokat (számtani közép $\pm$ SEM).

3.5 Koncentrációbecslés regresszióanalízissel

3.5.1 A regressziós függvény

Ha egy biológiai rendszerben egy agonistával úgy veszünk fel $E/[A]$ görbét, hogy a rendszerben már induláskor jelen van az adott agonista egy $c_x \neq 0$ koncentrációja, a kiértékelés során figyelembe kell venni a c_x -et mind a kiindulási állapot, mind a $E/[A]$ görbe egyes dózisaira adott válaszok létrehozásában. Ha a c_x -et figyelmen kívül hagyjuk, akkor a kapott válaszok el fognak térni a korrekt módon számíthatóktól (illetve azoktól, amelyeket $c_x = 0$ esetén kapnánk). A válasz torzulása függ a c_x nagyságától, közöttük az alábbi kapcsolat áll fent:

$$E' = 100 - \frac{100 - E_{\max} \cdot \frac{(c_x + c_{ad})^{n_H}}{(c_x + c_{ad})^{n_H} + EC_{50}^{n_H}}}{1 - \frac{E_{\max}}{100} \cdot \frac{c_x^{n_H}}{c_x^{n_H} + EC_{50}^{n_H}}}$$

ahol: c_x a $E/[A]$ görbe felvételét megelőzően már a rendszerben lévő agonistakonzentráció; E' a torzult válasz (a c_x ignorálásával számított hatás); c_{ad} a $E/[A]$ görbe felvétele során bemért agonistakonzentráció; $E_{\max}$, EC_{50} és n_H az intakt ($c_x = 0$) $E/[A]$ görbének a Langmuir-Hill egyenlet illesztésével nyert paraméterei, vagyis az intakt $E/[A]$ kapcsolat leírói.

Ha egy rendszer, amelynek ismerjük az intakt $E/[A]$ kapcsolatot egy adott agonistával, az adott agonistára megváltozott választ ad, ennek egyik lehetséges oka a receptorok (illetve a posztreceptorális jelátvitel) részleges előzetes aktivációja. Ebben az esetben, ha a fenti egyenletbe beírjuk az intakt $E/[A]$ kapcsolat paramétereit ($E_{\max}$, EC_{50} , n_H) és az egyenletet a torzult $E/[A]$ görbe pontjaira illesztjük, regressziós paraméterként (c_x) megkapjuk a $E/[A]$ görbe agonistájának azt a koncentrációját, amelyik (előzetesen bemérve) azonos (vagy hasonló) módosulást képes létrehozni a $E/[A]$ görbében, mint amit tapasztaltunk. A c_x akkor adja meg a konkrét torzító koncentrációt, ha a torzulás oka ténylegesen a $E/[A]$ görbe felvételéhez használt agonista egy már előzetesen is jelen lévő koncentrációja. Ha a torzulást okozó anyag nem azonos a $E/[A]$ görbe agonistájával, a c_x a $E/[A]$ görbe agonistájának azt a koncentrációját adja meg, amelyik a torzító koncentrációval ekvivalens a vizsgált hatás szempontjából. Mivel a c_x ebben az esetben is informatív mutatója a torzító koncentrációnak, a fenti összefüggést a továbbiakban „koncentráció-meghatározó” egyenletnek nevezzük.

3.5.2 A regressziós függvény levezetése

Tekintsünk egy nyugalmi állapotában állandó nagyságú kontrakciókat generáló biológiai rendszert, valamint egy agonistát, amely specifikus receptorhoz kötődve csökkenti az összehúzódások amplitúdóját (kontrakciós erő). A rendszer nyugalmi kontrakciós ereje (F_0) az agonista egy általunk bemért c_{ad} koncentrációjának jelenlétében F_{ad} lesz, amiből a választ (E_{ad}) meghatározhatjuk, mint a kiindulási erő százalékos csökkenését:

$$E_{ad} = \frac{F_0 - F_{ad}}{F_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad [1.]$$

Kifejezve az F_{ad} -ot az [1.] egyenletből:

$$F_{ad} = F_0 - E_{ad} \cdot \frac{F_0}{100} = F_0 \cdot \left(1 - \frac{E_{ad}}{100}\right) \quad [2.]$$

Vizsgáljuk meg azt az esetet, amikor a rendszer az adott agonista egy ismeretlen koncentrációját (c_x) tartalmazza. Ha ekkor mérjük be a c_{ad} -ot, torzult választ (E') kapunk, amelyet egy F_x kiindulási erő és a c_{ad} bemérése után kialakult $F_{(x+ad)}$ erő alapján számolunk:

$$E' = \frac{F_x - F_{(x+ad)}}{F_x} \cdot 100 = 100 - \frac{100F_{(x+ad)}}{F_x} \quad [3.]$$

Az F_x és az $F_{(x+ad)}$ kifejezhetők a c_x és a $(c_x + c_{ad})$ koncentrációk hatásaiból (E_x és $E_{(x+ad)}$), ahogy azt a [2.] egyenlet esetében láttuk:

$$E_x = \frac{F_0 - F_x}{F_0} \cdot 100 \quad \text{és} \quad E_{(x+ad)} = \frac{F_0 - F_{(x+ad)}}{F_0} \cdot 100 \quad ; \text{ ezekből:}$$

$$F_x = F_0 \cdot \left(1 - \frac{E_x}{100}\right) \quad \text{és} \quad F_{(x+ad)} = F_0 \cdot \left(1 - \frac{E_{(x+ad)}}{100}\right) \quad [4.] \text{ és } [5.]$$

A [4.] és [5.] egyenletből az F_x és $F_{(x+ad)}$ beírhatók a [3.] egyenletbe:

$$E' = 100 - \frac{100F_0 \cdot \left(1 - \frac{E_{(x+ad)}}{100}\right)}{F_0 \cdot \left(1 - \frac{E_x}{100}\right)} = 100 - \frac{100 - E_{(x+ad)}}{1 - \frac{E_x}{100}} \quad [6.]$$

Az E_x és az $E_{(x+ad)}$ kifejezhetők a Langmuir-Hill egyenlet segítségével a létrehozó koncentrációkból $/c_x$ és $(c_x+c_{ad})/$, valamint az adott agonista és receptora kapcsolatát leíró paraméterekből:

$$E_x = E_{\max} \cdot \frac{c_x^{n_H}}{c_x^{n_H} + EC_{50}^{n_H}} \quad \text{és} \quad E_{(x+ad)} = E_{\max} \cdot \frac{(c_x + c_{ad})^{n_H}}{(c_x + c_{ad})^{n_H} + EC_{50}^{n_H}} \quad [7.] \text{ és } [8.]$$

Mivel a c_x -et és a c_{ad} -ot ugyanazon agonista koncentrációinak tekintettük, a [7.] és [8.] egyenletben szereplő $E_{\max}$, EC_{50} és n_H paramétereket azonosak. A [7.] és [8.] egyenletből az E_x és az $E_{(x+ad)}$ beírhatók a [6.] egyenletbe, így E' visszavezethető a bemért koncentrációra (c_{ad}), valamint konstans paraméterekre (c_x , $E_{\max}$, EC_{50} , n_H):

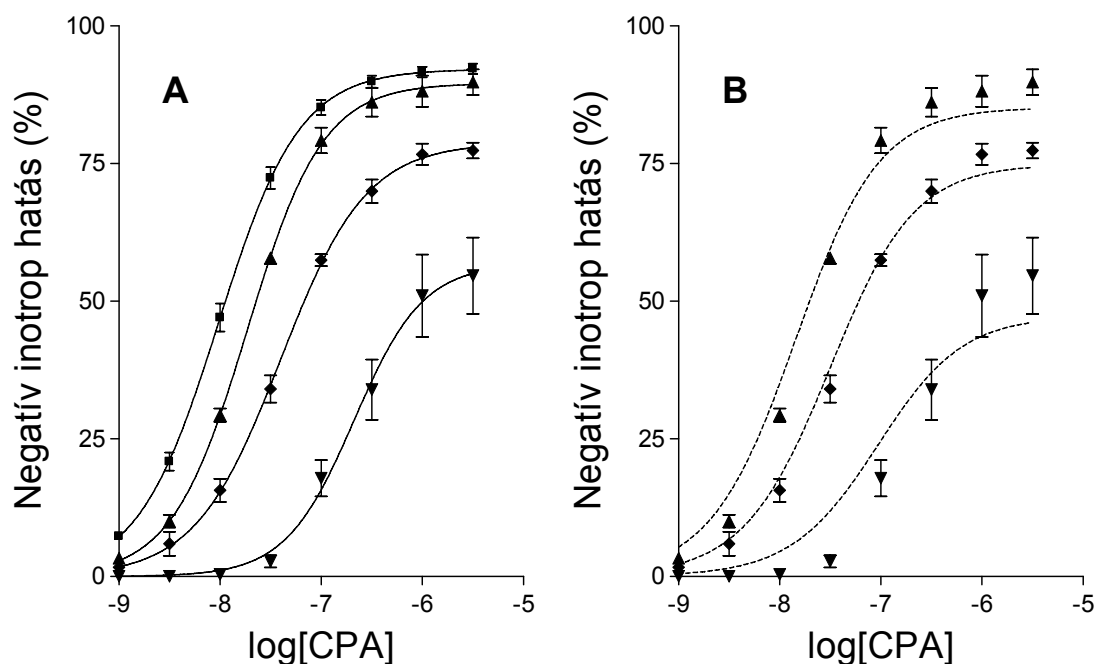
$$E' = 100 - \frac{100 - E_{\max} \cdot \frac{(c_x + c_{ad})^{n_H}}{(c_x + c_{ad})^{n_H} + EC_{50}^{n_H}}}{1 - \frac{E_{\max}}{100} \cdot \frac{c_x^{n_H}}{c_x^{n_H} + EC_{50}^{n_H}}} \quad [9.]$$

Amennyiben $c_x = 0$, akkor $E' = E$, ha viszont $c_x > 0$, akkor $E' < E$. Ha az E'/c_{ad} görbéhez rendelkezünk a neki megfelelő E/c_{ad} görbe $E_{\max}$, EC_{50} és n_H paramétereivel, vagyis az intakt $E/[A]$ kapcsolat azonos körülmények között meghatározott jellemzőivel, ezeket beírhatjuk a [9.] egyenletbe. Ha ezután a [9.] egyenletet mint regressziós függvényt illesztjük az $E' - c_{ad}$ pontokra, megkapjuk a c_x -et. Mivel a [9.] („koncentráció-meghatározó”) egyenlet nem tartalmazza a levezetés kezdetén használt rendszerspecifikus kontrakciós erőket, általános összefüggéshez jutottunk (Gesztelyi és mtsai, 2004).

3.5.3 A regressziós függvény validálása

A „koncentráció-meghatározó” egyenletet izolált tengerimalac bal pitvaron teszteltük. A meghatározandó anyagok, CPA, MC és VERA ismert koncentrációinak bemérése után $E/[A]$ görbét vettünk fel az előbb említett szerekkel, majd a $E/[A]$ görbék pontjaira illesztettük az egyenletet, amely a $E/[A]$

görbe felvételéhez használt szer intakt E/[A] görbéjének $E_{\max}$, EC_{50} és n_H paramétereit tartalmazta. Azok a becslések voltak a legpontosabbak, ahol CPA dózist kellett meghatározni, különösen az intakt CPA E/[A] görbe EC_{50} -éhez (jelen vizsgálatunkban: 9.7 nM) közel eső koncentrációk (3 nM, 10 nM) esetén (12. ábra; 5. táblázat).



12. ábra. A E/[A] görbék az A_1 receptor agonista CPA hatását mutatják izolált, ingerelt tengerimalac bal pitvarok négy csoportjának kontrakciós erejére. Az x tengelyen a CPA koncentráció tízes alapú logaritmusát ábrázoltuk, az y tengelyen pedig a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenését. Az azonos szimbólumok az **A** és a **B** részben ugyanazokat az átlagokat (számtani közép $\pm$ SEM) mutatják. Az első csoport ($\blacksquare$; $n=12$) képezte a kontrollt. A második ($\blacktriangle$; $n=4$), a harmadik ($\blacklozenge$; $n=5$) és a negyedik ($\blacktriangledown$; $n=5$) csoporthoz az E/[A] görbe felvételét megelőzően 3, 30 illetve 100 nM CPA-t mértünk be (a felsorolás sorrendjében). **A** rész: a folyamos vonalak a négy csoport adataira illesztett Langmuir-Hill egyenletet mutatják. **B** rész: a szaggatott vonalak a második, harmadik és negyedik csoport adataira illesztett „koncentráció-meghatározó” egyenletet ábrázolják.

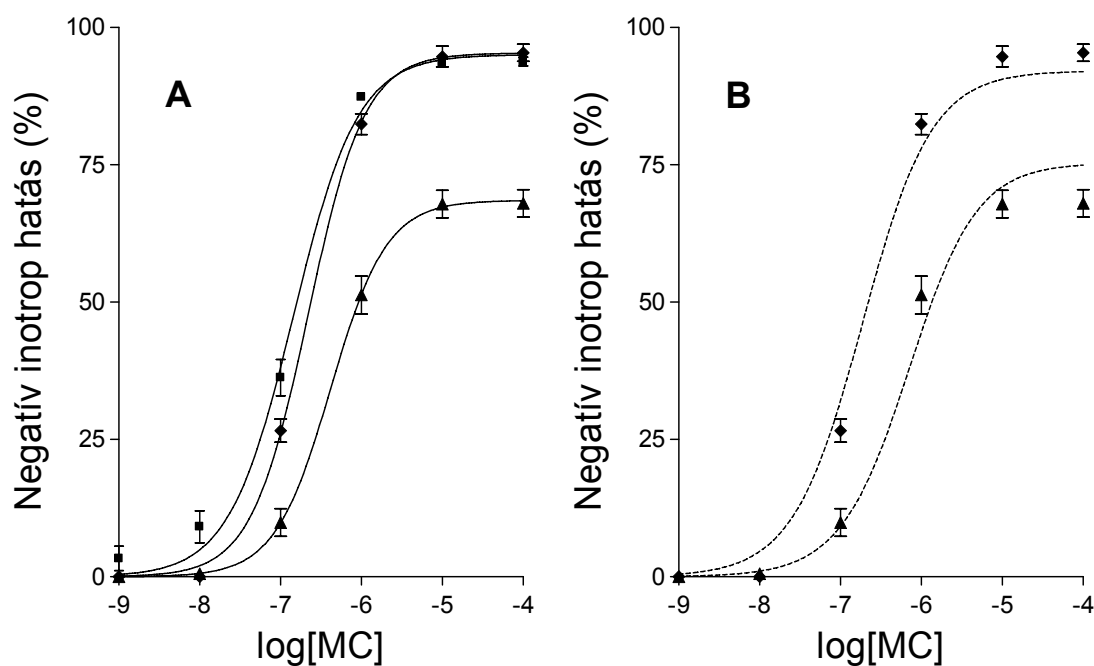
Figyelemreméltó pontosságot mutat, hogy a 30 nM CPA dózist becsli 27.1 nM c_x szignifikánsan különbözött a várt értéktől (5. táblázat). Ez a finom alulbecslés feltehetően a CPA kisfokú bomlását mutatja a rendszerben.

Az előzetesen bemért MC és VERA koncentrációkat a módszer jelentősen alulbecsülte (5. táblázat). A MC közepes mértékű bomlást mutatott a pitvarokban, ami a E/[A] görbe felvételét még nem befolyásolta érdemlegesen, az előzetesen

bemért (meghatározandó) MC koncentrációt viszont igen. A VERA hatása ezzel szemben elhúzódó volt, a dózisok hatása 15 percen belül sem állt be teljesen.

A „koncentráció-meghatározó” egyenlet illeszkedése az adatpontokra kevésbé volt szoros, mint a Langmuir-Hill egyenlet esetében. Az illesztés pontossága és a koncentrációbecslés precizitása között nem mutatkozott összefüggés (12., 13. ábra; 5. táblázat).

A módszer esetleges jövőbeni hasznosítására nézve fontos megfigyelés, hogy nem igényelte a meghatározáshoz használt és a meghatározandó agonista azonosságát, MC $E/[A]$ görbe segítségével hasonló pontossággal sikerült a CPA 100 nM-ját megbecsülni, mint CPA $E/[A]$ görbével (13. ábra; 5. táblázat).



13. ábra. A $E/[A]$ görbék a muszkarin receptor agonista MC negatív inotrop hatását mutatják izolált, ingerelt tengerimalac bal pitvarok három csoportjában. Az x tengelyen a MC koncentráció tízes alapú logaritmusát tüntettük fel, az y tengelyen pedig a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenését. Az azonos szimbólumok az **A** és a **B** részben ugyanazokat az átlagokat (számtani közép $\pm$ SEM) mutatják. Az első csoport (■; $n=5$) volt a kontrollt. A második (◆; $n=3$) és a harmadik (▲; $n=9$) csoporthoz az $E/[A]$ görbe felvételét megelőzően 200 nM MC-t illetve 100 nM CPA-t mértünk be (a felsorolás sorrendjében). **A** rész: a folyamatos vonalak a három csoport adataira illesztett Langmuir-Hill egyenletet mutatják. **B** rész: a szaggatott vonalak a második és harmadik csoport adataira illesztett „koncentráció-meghatározó” egyenletet ábrázolják.

A	3 nM CPA (n=4)	30 nM CPA (n=5)	100 nM CPA (n=5)
c_x CPA (nM)	5.2 (±1)	27.1 (±0.8) *	106.4 (±20.3)

B	200 nM MC (n=3)	100 nM CPA (n=9)
c_x MC (nM)	76.6 (±17.6) *	691.8 (±84.7) /93.5 nM (±17.6) CPA /

C	300 nM VERA (n=4)
c_x VERA (nM)	47.3 (±18.5) ***

5. táblázat. A „koncentráció-meghatározó” egyenlet illesztésével kapott becslések a CPA-val (**A**), MC-nal (**B**) és VERA-lal (**C**) felvett E/[A] görbék esetében. Felül az előzetesen bemért koncentráció, alatta pedig a rá vonatkozó becslés (c_x) van feltüntetve. A **B** panel utolsó oszlopában két becslés van: az egyik MC szint (c_x), a másik az ugyanakkora inotrop hatást kifejtő CPA koncentráció (amit a c_x-ből számoltunk a Langmuir-Hill egyenlettel). A becslések alatt jeleztük eltérésük szignifikancia-szintjét a bemért koncentrációktól.

4. Megbeszélés

4.1 Az extracelluláris és intracelluláris adenozin kötőhelyek aktiválhatóságának változása tiroxin kezelt tengerimalacok pitvarán

Ismeretes, hogy a T_4 kezelés mélyreható változásokat idéz elő a szervezet különböző receptoraiban. Ennek a regulációnak klasszikus példája az a sajátos hatás, amely az adrenerg α - és β -receptorok szintjén játszódik le. A hyperthyreosis az α -adrenerg receptorok denzitását csökkenti, míg a β -adrenerg receptorsűrűséget jelentős módon fokozza (Kunos, 1977). Ez a klasszikus nézet az utóbbi években csupán annyit változott, hogy bizonyos altípus szelektivitást mutattak ki. T_4 kezelt patkányokban az α_{1A} és α_{1B} receptorszám csökkenése mellett az α_{1D} receptorszám fokozódását írták le (Han és mtsai, 1995). Hasonló a helyzet a β -adrenerg receptorok vonatkozásában is. Itt is differenciált szabályozásról van szó, miszerint a T_4 kezelés során a β_1 - receptorok upregulációja következik be, míg a β_2 -receptorok száma nem változik vagy éppen csökken (O'Donnel és Wanstall, 1986).

Mindemellett kimutatták, hogy T_4 fokozott jelenléte csökkenti a myocardialis muszkarin receptorok számát (Ishac és Pennefather, 1983), fokozza a szerotonin és a tromboxán által kiváltott vascularis kontrakciókat.

Nagyon kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre abban a vonatkozásban, hogy miként befolyásolja a T_4 tartós jelenléte a cardiovascularis Ado receptorokat. Voltak olyan korábbi jelzések, hogy a hypothyreosis erősíti az Ado által izolált zsírsejt AC-ra kifejtett gátló hatását (Malbon és mtsai, 1985). A szívizom és az ér simaizom Ado receptorait illetően is csak szerény mennyiségű irodalmi adatra támaszkodhatunk (Szentmiklósi és mtsai, 1992; Kaasik és mtsai, 1994).

A disszertációban részletezett kísérletek során megállapítottuk, hogy a T_4 kezelés a cardiovascularis Ado receptor válaszokat jelentősen módosítja. Pitvaron az Ado által létrejövő kardiodepresszió jelentősen mérséklődik. Hasonló jelenséget figyeltünk meg a membrán Ado transzporterek és az intracellulárisan ADA

szubsztrátjait nem képező szintetikus Ado analógok esetében is (CPA, CIAdo, R-PIA, NECA).

Mivel a kísérleteinkben alkalmazott tengerimalac pitvarizomzat tipikusan A₁ receptorokat hordozó szövet, a szintetikus Ado analógokkal kapott eredmények alapján feltételezhető, hogy a hatások – legalábbis részben – ezen receptorok szintjén manifesztálódnak.

A tartósan jelenlévő thyreoid hormonok mennyisége és a myocardialis A₁ receptorok válaszkészsége között fordított összefüggés van, ami megnyilvánul az A₁ receptor agonisták hyperthyreosisban tapasztalt csökkent negatív inotrop hatásában is (Szentmiklósi és mtsai, 1992; Kaasik és mtsai, 1994). A jelenség mechanizmusát a számos vizsgálat ellenére még nem minden részletében ismerjük. Azt viszont tudjuk, hogy az A₁ receptorok jelátvitelének több szereplőjét is befolyásolják a thyreoid hormonok.

Az A₁ receptorok száma változatlan marad (Bumgarner és mtsai, 1989) vagy emelkedik T₃ és T₄ tartós jelenlétében (El-Ani és mtsai, 1994; Kaasik és mtsai, 1994), így a negatív inotrop hatás csökkenése nem magyarázható az Ado receptor-denzitásban beállt változással. Ismereteink szerint egy közlemény számol be az Ado receptorszám csökkenésről (Rapiejko és mtsai, 1987), de ahogy azt Bumgarner és mtsai (1989) kifejtették, ebben a vizsgálatban agonistát használtak a ligandkötési assay-hez, ami miatt eredményüket kritikával kell fogadni, mivel az agonista assay csak az aktuálisan G-proteinhez kötődött A₁ receptorokat mutatja ki, a disszociált állapotban lévőket nem. Nem tapasztaltak az A₁ receptor ligandjaival szembeni affinitásában sem változást hyperthyreosisban (El-Ani és mtsai, 1994), és a fent említett vizsgálatok egyike sem talált a G-proteinek koncentrációjában szignifikáns eltérést.

Az Ado pitvarizomzaton nemcsak extracelluláris A₁ receptorokon fejti ki kardiodepresszív hatását, hanem aktiválja az intracelluláris, az AC belső felszínére lokalizálódó P-kötőhelyeket is, ezért megkülönböztetett figyelemmel vizsgáltuk, hogy ezen kötőhelyek esetleges modulációja vajon szerepet játszik-e a T₄ hatásában az adenozinerg szignalizációra. Ismeretes, hogy a CF az intracelluláris ADA specifikus gátlószere, ezért ezt a vegyületet, ill. a nem-specifikus ADA gátló EHNA-t alkalmaztuk kísérleteinkben az intracelluláris Ado enzimatis bomlásának megakadályozására. Irodalmi adatok alapján bizonyított, hogy – ellentétben a nyúllal (Schrader és West, 1990) és a patkánnyal (Meghji és

mtsai, 1988) – a tengerimalac pitvari izomrostok azzal az egyedülálló sajátossággal rendelkeznek, hogy nem tartalmaznak extracelluláris ADA-t (Schutz és mtsai, 1981). Ebből kifolyólag az ADA specifikus gátlószerezrel történő bénítása elsődlegesen az intracelluláris Ado koncentrációját kell, hogy fokozza.

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy az S kezelt pitvarokhoz képest a T₄ kezelt állatokból származó pitvaroknál az Ado hatásának erőteljesebb fokozódása következik be az ADA gátlása után. Ez a jelenség felvetette azt, hogy (1.) a T₄ kezelés esetleg fokozza a szívizomrostokban az ADA aktivitását, amelynek következtében az Ado intracelluláris komponense gyakorlatilag teljesen megszűnik, (2.) a másik lehetőség, hogy a P-site-ok számának növekedése vagy azok érzékenysége fokozódása következik be. Ez a jelenség feltehetően csak az ADA aktivitás teljes gátlása után manifesztálódik. A jelenség specifikusabb megközelítése érdekében kísérleteket végeztünk két szelektív P-site agonistával, DAdo-val és ARA-A-val, amelyek extracelluláris hatásokat nem fejtenek ki. Azt tapasztaltuk, hogy a vegyületek negatív inotrop hatása T₄ kezelés után jelentősen mérséklődik, sőt a DAdo esetében a klasszikus farmakológiában "Umkehr"-effektusként ismert jelenséghez hasonlóan inverz kontraktilitásfokozódás fejlődik ki. CF hatására a szelektív P-kötőhely aktivátorra adott fiziológiás válasz jelentősen fokozódik, de ez a potenciálás drámai méreteket ölt, ha a kísérleteket T₄ kezelt tengerimalacokból származó pitvari munkaizomzaton végezzük. Mindezek alapján feltételezhető, hogy az általunk felvetett mindkét lehetőség fennállhat, tehát a fokozott ADA aktivitás mellett egy P-site upregulációval is számolnunk kell.

Figyelemreméltónak tartjuk azt a megfigyelésünket, hogy az extracelluláris receptorhatások és az intracelluláris P-site effektusok között érdekes összefüggés áll fenn. Ez az összefüggés abban áll, hogy amennyiben az Ado hatását vizsgáltuk ADA gátló CF jelenlétében, akkor fiziológiás körülmények között a pD₂ értékek alapján 2-szeres hatásfokozódást kaptunk. Amennyiben az extracelluláris hatásokat 8-PT-vel gátoltuk, akkor ez a hatásfokozódás 7-szeres volt. Feltételezhető, hogy az extracelluláris Ado receptorok és az intracelluláris P-site között negatív jellegű funkcionális kölcsönhatás áll fenn.

Jelen kísérleteink alapján még nem dönthetők el, hogy mi lehet a szerepe hyperthyreosisban az intracelluláris P-site viselkedésének. Ami kiemelendő, az az, hogy T₄ kezelés után, befolyásolatlan ADA aktivitás mellett, a P-site

érzékenységet jelző P-site agonista hatások redukálódnak, de az ADA gátlása után jelentősen fokozódnak. Mivel kimutatott, hogy bizonyos patológiás körülmények között (pl. hypoxia) az intracelluláris ADA aktivitás jelentősen lecsökken (Szentmiklósi és mtsai, 1982), feltételezzük, hogy ennek a jelenségnek a T_4 hatás finomabb regulációjában komoly jelentősége lehet.

4.2 A nukleozid transzport és az adenzin dezamináz gátlása által létrehozott változások elemzése hyperthyreoid pitvaron

Fiziológiásan a NT a szív sejtjein, beleértve a cardiomyocytákat is, az intracelluláris tér felé irányul (Deussen, 200a, b). Ezzel összhangban a NT blokádjá növeli a szöveti Ado-szintet és ezáltal erősíti az Ado kardioprotektív hatását (De Jong és mtsai, 2000; Keeling és mtsai, 2000). Ismert továbbá, hogy az Ado-t bontó ADA gátlása szintén fokozza az endogén Ado hatásait (Keeling és mtsai, 2000), mivel mérsékli az Ado eliminációját. Mindkét módszer potenciózza az exogén Ado hatását is (Szentmiklósi és mtsai, 1982). A NT gátlással és az ADA bénításával elért hatásfokozódás azonban a hasonlóság ellenére nem teljesen egyforma.

Ebben a vizsgálatunkban a NT és az ADA gátlásának az Ado negatív inotropiájára kifejtett hatását hasonlítottuk össze S és T_4 kezelt tengerimalac pitvarokon. Az alkalmazott két NT blokkoló, a kevésbé szelektív DP és az ENT1 transzporterekre nagy szelektivitású NBTI egyaránt hatékonyan csökkentette az Ado $E/[A]$ görbe EC_{50} -ét (8. ábra), a maximális hatást (E_{max}) azonban nem befolyásolták szignifikánsan.

Az ADA két gátlója, a kevésbé szelektív (PDE_2 inhibitor mellékhatással bíró) EHNA és az igen szelektív CF kisebb balratolódást okoztak az Ado $E/[A]$ görbéjében, mint a NT blokkerek. Ezt az okozta, hogy az EHNA és a CF csökkentették az exogén Ado eliminációját, de kisebb mértékben, mint az NT blokkolók. Az ADA gátlók hatásukat tekintve ugyanakkor két egyedi vonást mutattak a NT gátlókkal összehasonlítva: (1.) növelték az Ado $E/[A]$ görbék E_{max} -át; (2.) érzékenyek voltak a thyreoid státuszra. Ez azt jelenti, hogy a T_4 kezelt pitvarokon erőteljesebben csökkentették az EC_{50} -et (4. táblázat) és nagyobb mértékben növelték az E_{max} -ot, mint az S kezeltéken (8. ábra).

A különbség létrehozásában fontos szerepe lehet annak, hogy míg az NT blokkolók az $[Ado]_{ISF}$ -t növelik és ugyanazon mechanizmus révén az intracelluláris Ado koncentrációt csökkentik, addig az ADA gátlói közvetlenül az intracelluláris Ado szintjét növelik, és csak ezáltal emelik az $[Ado]_{ISF}$ -t. Mindez arra utal, hogy elsődlegesen a citoszól Ado koncentrációjának emelkedése (az Ado-bontás gátlása révén) illetve csak az $[Ado]_{ISF}$ növekedése (NT gátlás által) részben eltérő mechanizmussal fejt ki hatását az adenozinerg mechanizmusokra. Ezt a feltételezést támogatja, hogy a többlet T_4 által megváltoztatott környezet az ADA gátlók hatását módosította nagyobb mértékben. Feltételezésünket támasztja alá azon eredményünk is, hogy aktív ADA mellett a foszfatáz gátló kantaridin alig gátolta az Ado negatív inotrop hatását (noha az részben foszfatázok által mediálódik; 2. ábra), míg funkcionálisan eliminált ADA esetében ez a gátlás látványossá vált, különösen hyperthyreoid állapotban (9. ábra). Mivel a SERCA gátlója, a ciklopiazonsav nem befolyásolta az Ado-ra adott inotrop választ, a SERCA-PLB rendszernek mint molekuláris effektornak feltehetően nincs jelentős szerepe tengerimalac bal pitvaron az adenozinerg válaszban és az ADA gátlók okozta, jelen vizsgálatban megfigyelt változásokban sem.

Mindezek az eredményeink jól korrelálnak a thyreoid status változása során nyert biokémiai vonatkozású irodalmi adatokkal, megvilágítva az Ado jelátviteli rendszerének összetettségét.

Az AC szintjének illetve aktivitásának változása ellentmondásos. Pracyk és Slotkin (1991) hyperthyreoid patkányban β -receptoraktiváció során fokozott szignáltranszdukcióról tesznek említést, amelyben az AC is érintett, mások csak a tendenciát találták hasonlóknak, de szignifikáns eltérés nélkül (El-Ani és mtsai, 1994). Bumgarner és mtsai (1989) patkány zsírsejteken az AC csökkent működését tapasztalták hyperthyreoid állapotban az A_1 receptor – AC rendszer vizsgálata során. Újabb eredmények szerint hyperthyreota patkány szívében az AC mennyisége nem, de aktivitása csökken, ennek következtében a nagyobb β -receptorszám ellenére a β -receptor agonisták hatása nem változik lényegesen (Ojamaa és mtsai, 2000b).

A thyreoid hormonok növelik a SERCA mennyiségét és funkcióját, ugyanakkor csökkentik a mennyiségét és a hatékonyságát a SERCA gátló regulátorának, a PLB-nak (Arai és mtsai, 1991; Kiss és mtsai, 1994; Ojamaa és mtsai, 2000a). Ez pitvarra és kamrára egyaránt jellemző, de eltérő mértékben

(Kaasik és mtsai, 1997a; Seppet és mtsai, 1998; Shenoy és mtsai, 2001). A SERCA pitvaron és kamrán közel hasonló mennyiségben van jelen, de extra T_3 illetve T_4 hatására a pitvaron lényegesen nagyobb az expresszió fokozódása, mint kamrán. Euthyreota pitvaron a PLB a kamrához képest jóval kisebb mennyiségben fordul elő, hyperthyreoiddá válva viszont a csökkenés hasonló az egész szívben. Shenoy és mtsai (2001) vizsgálatában a SERCA/PLB arány patkány pitvaron 1.9-ről 5.4-re nőtt, míg kamrán csak 0.3-ről 0.4-re. Érdekes, hogy míg a kontraktilitási és relaxációs paraméterek ($+dT/dt$, $-dT/dt$) ennek a trendnek megfelelően változtak (Kaasik és mtsai, 1997a; Shenoy és mtsai, 2001), a kontrakciós erő amplitúdója csak kamrán nőtt, pitvaron változatlan maradt (Kaasik és mtsai, 1997a). A SERCA/PLB arány növekedése pozitív inotrop és lusitrop hatású, de a β -adrenerg stimulációra adható válasz csökkenését vonja maga után (Kaasik és mtsai, 1997b). Ennek az az oka, hogy a cAMP-függő szabályozási utak a PLB-on keresztül hatnak a SERCA-ra, a PLB mennyiségének thyreoid hormon-függő csökkenése pedig ezt a kaput szűkíti. Ez az A_1 receptor jelátvitelének egyik útvonalát is érinti (2. ábra), ami feltehetően hozzájárul az A_1 receptor agonisták csökkent hatásához hyperthyreoid szíven. Ennek a mechanizmusnak azonban pitvaron nincs jelentős szerepe, mert a pitvar PLB tartalma mind euthyreoid, mind hyperthyreoid állapotban jóval kisebb a kamráénál (Shenoy és mtsai, 2001), ami miatt az Ado pitvari hatásában (különösen a direkt hatásban) a SERCA – PLB komplex kis súllyal szerepel.

Hyperthyreoid állapotban nő a szarkolemmális L-típusú Ca^{2+} áram is (Rubinstein és Binah 1989; Mager és mtsai, 1992; Kreuzberg és mtsai, 2000), melynek hátterében egyes szerzők az L_{Ca} denzitásának növekedését találták (Kreuzberg és mtsai, 2000), míg mások az L_{Ca} csökkenését (Seppet és mtsai, 1993; Gøtzsche, 1994). A T_3 és T_4 fokozzák a ryanodine receptor expresszióját is, tovább növelve az SR Ca^{2+} forgalmát (Arai és mtsai, 1991). Cernohorsky és mtsai (1998) szerint a $Na^+ - Ca^{2+}$ cserélő és a Na^+/K^+ -ATP-áz funkciója nem módosul lényegesen, Shenoy és mtsai (2001) pedig a $Na^+ - Ca^{2+}$ cserélő/SERCA arány kisfokú csökkenését találták pitvaron és kamrán is. Mindez az SR részvételének thyreoid hormon-függő növekedését mutatja a Ca^{2+} tranziens létrehozásában. Összefoglalásul elmondható, hogy a Ca^{2+} homeosztázis fehérjéinek többsége közös célpontja szíven a thyreoid hormonoknak és az Ado-nak.

Megemlíthető még, hogy kamrán a thyreoid hormonok β típusú miozin nehézlánc (β -MHC) helyett az α -MHC expresszióját serkentik, míg pitvaron a thyreoid státusztól függetlenül α -MHC fordul elő (Bottinelli és mtsai, 1995). Az α izoforma mennyisége azonban pozitív korrelációt mutat a thyreoid hormonok szintjével pitvaron és kamrán egyaránt (Shenoy és mtsai, 2001).

A hyperthyreoid állapot növeli a NT kapacitását neuroectodermális eredetű sejteken (Fideu és Miras-Portugal, 1992; Fideu és mtsai, 1994) csakúgy, mint cardiomyocytákon (Smolenski és mtsai, 1995). A nagyobb transzportkapacitás csökkenti az exogén és (fiziológias körülmények között) az endogén Ado kapcsolódási esélyét az extracelluláris Ado receptorhoz, ami a hatékonyság csökkenésében nyilvánul meg. A NT változása befolyásolja mindazon exogén Ado receptor agonista hatékonyságát is, amelyek transzportálódnak és amelyeket az intracelluláris enzimek át tudnak alakítani, ezekre nézve ugyanis mindig koncentráció-grádiens fog fennállni a sejtmembrán két oldalán (amíg a beadott mennyiség el nem fogy). Mivel kísérleteink szerint a relatíve stabil Ado receptor agonisták hatékonysága is csökken hyperthyreosisban, a fokozott NT kapacitás csak részben lehet felelős a jelenségért.

Az Ado (és az enzimatikusan hozzáférhető analógok) hatékonysága csökkenhet az Ado-t elimináló enzimek fokozott aktivitása esetén is. Smolenski és mtsai (1995) az Ado kináz (az intracelluláris Ado fő eliminálója) aktivitásának növekedését tapasztalták, bár az ADA (tengerimalacban kizárólag intracelluláris előfordulású Ado-bontó enzim) aktivitásának csökkenésével együtt. Tekintettel a relatíve stabil analógok viselkedésére, a fokozott intracelluláris elimináció (sem önmagában, sem a nagyobb NT kapacitással együtt) nem lehet kizárólagos oka az A_1 receptor agonisták csökkent hatásának hyperthyreosisban.

Más Ado-t metabolizáló enzim is érzékeny a thyreoid hormonszintre, Smolenski és mtsai (1995) az ekto-5'-nukleotidáz (az extracelluláris Ado-termelés kulcsenzime) aktivitásának csökkenéséről számoltak be, amely szerintük (az Ado kináz fokozott működésével együtt) a hyperthyreoid myocardiumon $[Ado]_{ISF}$ csökkenést okozna. Újabb eredmények ezt nem erősítették meg, Wink és mtsai (2003) glioma sejtvonalon, Carneiro-Ramos és mtsai (2004) pedig patkány cardiomyocytákon az ekto-5'-nukleotidáz aktivitásának növekedését írták le T_3 kezelés után, melynek hátterében az enzim mRNS-ének fokozott transzkripcióját mérték ki.

Mint a fentiekből is kitűnik, a hyperthyreosis és az Ado jelátviteli rendszerének viszonya – a külön-külön rendelkezésre álló nagyszámú irodalmi adat ellenére – meglehetősen komplexnek tűnik. Ezen belül külön figyelmet érdemelnek azok a folyamatok, amelyeket az intracelluláris Ado koncentráció változásai során beindult biokémiai utak aktiválódása jellemez.

4.3 A PDE₂ gátlásának módosult hatása hyperthyreoid pitvaron

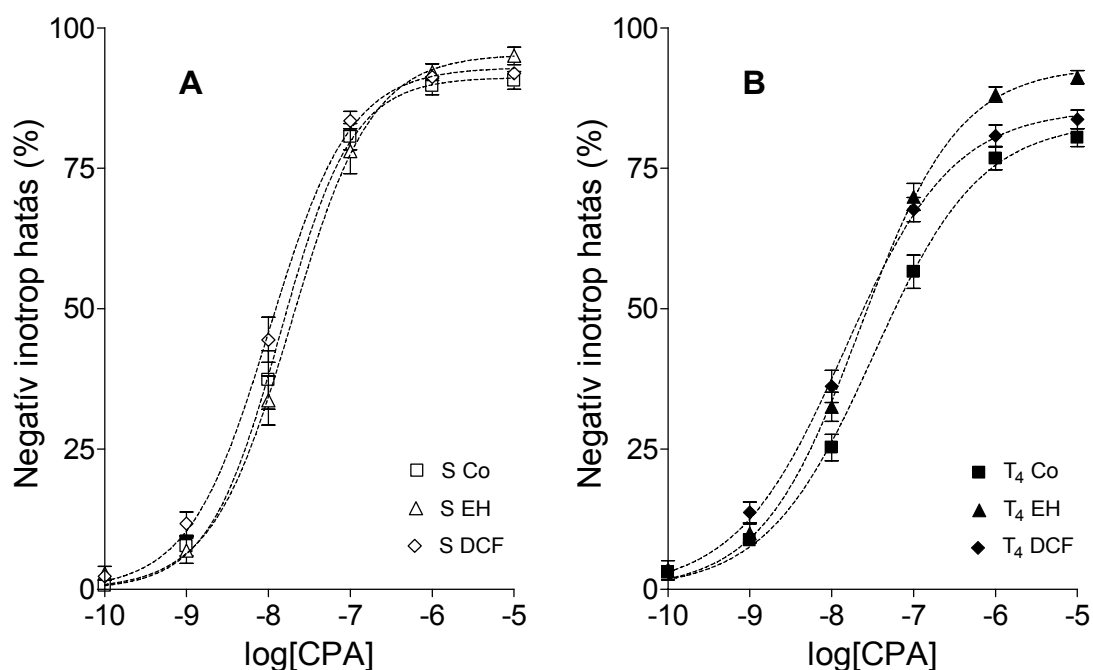
Az NBTI és az EHNA az 50 perces inkubáció alatt egyaránt szignifikánsan csökkentette az eu- és a hyperthyreoid pitvarok kontrakciós erejét (10. ábra). Ezt a szöveti Ado-szint megnövekedésével magyarázhatjuk, ugyanis mind a NT, mind az ADA gátlása növeli a $[Ado]_{ISF}$ -t, ami a sejtfelszíni A₁ receptoron keresztül pitvaron erőteljes negatív inotropiát mediál (Shryock és Belardinelli, 1997). Az NBTI által létrehozott kontrakciós erő csökkenés nem különbözött az eu- és a hyperthyreoid preparátumokon. Mivel az Ado-nal szembeni válaszkészség kisebb hyperthyreosisban (Szentmiklósi és mtsai, 1992; Kaasik és mtsai, 1994), ez nagyobb Ado felhalmozódást jelez a T₄ kezelt pitvarokon NT gátlás hatására, ami viszont fokozott inward Ado fluxusra utal hyperthyreoid állapotban. Ezzel szemben EHNA jelenlétében a hyperthyreoid pitvarok kontrakciós ereje kevesebbet csökkent, aminek többféle magyarázata is lehet (kisebb ADA aktivitás, nagyobb PDE₂ aktivitás), ezért további adatokra volt szükség.

Elkerülendő az inkubálószer hatását a E/[A] görbe felvételéhez használt exogén A₁ receptor agonistára, a relatíve stabil CPA-val vettük fel a E/[A] görbét az *in vitro* kezelés után. A CPA nem bomlik a cardiomyocytákban, ezért sem az NBTI, sem az EHNA nem befolyásolja érdemben a koncentrációját. Az NBTI erőteljesen csökkentette a CPA-ra adott választ mind az S, mind a T₄ kezelt pitvarokon (11. ábra). A CPA csökkent hatása azzal függ össze, hogy az NT blokád következtében megemelkedett az $[Ado]_{ISF}$, ami még az *in vitro* kezelés ideje alatt stimulálta az A₁ receptorokat, amit a kontrakciós erő csökkenése is jelez (10. ábra). Ennek következtében az A₁ receptorok negatív inotrop kapacitásának egy része „elhasználódott” a későbbi CPA E/[A] görbe szempontjából, vagyis a CPA kisebb hatásúnak mutatkozott (ezt a jelenséget fejezi ki egzakt formában a „koncentráció-meghatározó” egyenlet; ld.: Eredmények). Mindez nincs

ellentmondásban az NBTI-nek az Ado $E/[A]$ görbéjére gyakorolt ellentétes (potencírozó) hatásával, az előzőekben ismertetett a kísérleti elrendezésben ugyanis az endogén Ado akkumulációjának (illetve az Ado jelátviteli hatékonysága változásának) következményeit teljesen elfedte az exogén Ado megkímélődése és ezért fokozott hatása, a jelen elrendezésben viszont csak az endogén Ado koncentrációjának illetve az Ado jelátviteli hatékonyságának változása módosította az exogén agonista CPA hatását. A T_4 kezelt pitvarokon kifejezettebb volt a CPA hatásának visszaszorulása (11. ábra), ami megerősíti korábbi feltételezésünket a hyperthyreoid állapot fokozott cardialis NT-járól, melynek gátlása nagyobb $[Ado]_{ISF}$ növekedést képes okozni.

EHNA jelenlétében azonban az S kezelt pitvarokon megtartott, a T_4 kezeltéken pedig egyenesen potencírozott CPA válaszkésztséggel találkoztunk (11. ábra). Ez utóbbi megfigyelés a kevésbé csökkent inotropiával együtt (10. ábra) arra mutat, hogy az EHNA hatását nem lehet kizárólag (vagy döntően) az $[Ado]_{ISF}$ változására visszavezetni, mint az NBTI-ét. Az EHNA kezelt pitvarok hyperthyreosisban tapasztalt fokozott CPA-érzékenysége alapján elvethetjük azt a felvetést is, hogy az eleve csökkent ADA aktivitás magyarázná az EHNA kisebb negatív inotrop hatását a T_4 kezelt pitvarokon. Az EHNA és az NBTI hatásában tapasztalt különbségeket az EHNA két, az NBTI-re nem jellemző tulajdonsága okozhatja: (1.) az intracelluláris Ado-szintet is növeli, mivel az ADA tengerimalacban csak sejten belül fordul elő (Schutz és mtsai, 1981); (2.) szelektív PDE_2 gátló hatása is van (a PDE -okon belül).

Az EHNA elsőként említett sajátossága feltehetően hozzájárul az A_1 receptorfunkció hatásosságának növeléséhez. Egy a jelen értekezésben nem részletezett, de a most tárgyalt vizsgálathoz hasonló metodikával lefolytatott kísérletünkben az EHNA-t 2'-deoxycoformycinnel (Pentostatin; DCF), egy igen szelektív ADA gátlóval hasonlítottuk össze, mely utóbbinak nincs befolyása a PDE -ok által mediált folyamatokra (Rivet-Bastide és mtsai, 1997). Mindkét szer fokozta CPA-ra adott választ, euthyreoid pitvaron csak jelzett formában, hyperthyreoid preparátumon viszont szignifikánsan (14. ábra). Az EHNA ebben az összehasonlításban hatékonyabbnak bizonyult, mint a DCF (különösen az E_{max} növelése terén), tehát az A_1 receptor által használt jelátvitel hatékonyságának növekedése nem magyarázható pusztán az ADA gátlása miatt megemelkedett intracelluláris Ado koncentrációval (nem közölt eredmények).



14. ábra. Az *in vitro* kezelés hatása euthyreoid (A) és hyperthyreoid (B) bal pitvarok CPA-val szembeni érzékenységre. Az x tengelyen a CPA koncentráció tízes alapú logaritmusát ábrázoltuk, az y tengelyen pedig a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenését. A szimbólumok számtani közepet ($\pm$ SEM) mutatnak. A világos szimbólumok az oldószerkezelt, a sötét szimbólumok a T_4 kezelt pitvarokat jelentenek. A négyzetek mutatják a kontroll alcsoportokat, a rombuszok a DCF kezelt, a háromszögek pedig az EHNA kezelt alcsoportokat. A pontozott vonal az adatokra illesztett Langmuir-Hill egyenletet reprezentálja. Az EHNA kevésbé hatékony PDE_2 gátló (mikromólos nagyságrend), mint amilyen ADA inhibitor (nanomólos nagyságrend), ezért a PDE_2 gátlás markánsabbá tételéhez ezekben a kísérletekben az EHNA-t (és az összehasonlítás hitelessége kedvéért a DCF-t is) magasabb koncentrációban alkalmaztuk (100 μ M).

Az EHNA PDE_2 gátló tulajdonságánál fogva növeli az intracelluláris cAMP mennyiséget és a protein kináz A általi foszforilációt, a szívben ugyanis a PDE_2 , ha nem is a legjelentősebb, de szabályozója a cAMP-függő folyamatoknak (Rivet-Bastide és mtsai, 1997; Vandecasteele és mtsai, 2001). A protein kináz A pitvaron csökkenti a PLB és növeli az L_{Ca} aktivitását, ami fokozza az A_1 receptor stimuláció lehetőségét egy erőteljes válaszra, amely épp ellentétesen befolyásolja ezeket a struktúrákat (2. ábra). Mivel a PLB mennyisége kicsi pitvaron és csak tovább csökken hyperthyreosisban (Shenoy és mtsai, 2001), szerepe nem látszik jelentősnek. Az L-típusú Ca^{2+} áram viszont jelentős szerepet tölt be pitvaron, így hatékony effektora a rá konvergáló jelátviteli utaknak.

A vizsgálataink tehát szinergiát mutatnak az *in vitro* EHNA kezelés és az *in vivo* T₄ kezelés között az A₁ receptor mediálta negatív inotropia szintjén. Három egymást nem kizáró lehetőséget vethetünk fel ennek magyarázatára:

1. Hyperthyreoid milióban az ADA gátlás fokozza a pitvari A₁ receptor negatív inotrop válaszkészségét. Még nem közölt adataink alátámasztják, hogy ez a mechanizmus hozzájárul az A₁ receptor agonisták potencírozott hatásához (14. ábra).

2. Elképzelhető, hogy a PDE₂ aktivitása nagyobb hyperthyreosisban.

3. A hyperthyreoid állapotra fokozott L-típusú Ca²⁺ áram jellemző (Rubinstein és Binah, 1989; Kreuzberg és mtsai, 2000), ami potencírozza az A₁ receptor agonisták hatását. Ezt alátámasztja, hogy az acetilkolin nagyobb mértékben volt képes csökkenteni az L-típusú Ca²⁺ áramot hyperthyreoid tengerimalac szívéen, mint euthyreoid állatén (Mager és mtsai, 1992).

Az előző vizsgálatunkban az ADA gátlók növelték az Ado E/[A] görbék E_{max}-át, továbbá a T₄ kezelt pitvarokon erőteljesebben potencírozták az Ado-ra adott választ, mint az S kezeltéken, szemben az NT blokkolók hatásával (8. ábra). Ez a két egyedi vonás párhuzamba állítható az EHNA jelen vizsgálatunkban mutatott azon tulajdonságával, hogy markánsabban hatott a többlet T₄ által módosított környezetben, ahol is növelte az E_{max}-ot (11. ábra). Ezek tehát jellemző vonásai az ADA gátlók hatásának mind Ado, mind CPA E/[A] görbék esetében (8., 11., 14. ábra). Ezen túlmenően a 8. ábrán, bár szuperponálódik rajta az endogén és az exogén Ado szintjére gyakorolt befolyás, észrevehető, hogy az EHNA erőteljesebben növelte az E_{max}-ot, mint a CF, noha mindkét szerrel teljes ADA gátlás hozható létre az alkalmazott koncentrációban. Ez az EHNA PDE₂ gátló hatásának kifejeződéseként interpretálható, összhangban a jelen vizsgálat konklúziójával.

4.4 A₁ receptor agonisták koncentrációbecslésének új lehetősége

Bomlékony endogén molekulák szöveti koncentrációját nehéz az élő szervezetben megbízhatóan meghatározni, különösen az erősen kompartmentalizálódó anyagok esetében, mint például az Ado. A szív interstitiumának Ado tartalmát ugyanakkor fontos lenne megbízhatóan mérni,

mivel az Ado alapvető szerepet játszik a szív ischaemiával és hypoxiával szembeni védelmében, melyekben hatását döntően sejtfelszíni Ado receptorok mediálják (összefoglalóként ld.: Sommerschild és Kirkeboen, 2000; Headrick és mtsai, 2003). Az emlős szív fő Ado receptor altípusa az A_1 receptor (összefoglalóként ld.: Shryock és Belardinelli, 1997).

Jól ismert, hogy az A_1 receptorok aktivációja erőteljesen és jól mérhetően csökkenti a szív kontrakcióinak erejét (Szentmiklósi és mtsai, 1982, 1992; összefoglalóként ld.: Shryock és Belardinelli, 1997). Első ránézésre tehát az A_1 receptor mediálta negatív inotropia (mint hatás) alkalmasnak látszik exogén A_1 receptor agonisták vagy az $[Ado]_{ISF}$ változásának meghatározására a Langmuir-Hill egyenlet (ld.: Anyagok és módszerek, azon belül: Adatfeldolgozás) segítségével. Ez az eljárás a bazális $[Ado]_{ISF}$ mérésére jellegéből adódóan nem alkalmas, de az $[Ado]_{ISF}$ változásainak megbízható meghatározása is fontos információt szolgáltatna. Ez a módszer azonban megköveteli a receptoraktiváció és a receptorközei koncentráció kapcsolatát jellemző E_{max} , EC_{50} és n_H paraméterek ismeretét, amelyeket csak megfelelő $E/[A]$ görbe kiértékelése útján lehet nyerni. Az Ado-nal felvehető $E/[A]$ görbe viszont erre nem alkalmas, mert a beadott Ado jelentős része transzportálódik és metabolizálódik a myocardiumban, mire eléri az A_1 receptorokat, tehát nincs biztos ismeretünk a hatáshoz tartozó receptorközei koncentrációról. Az $[Ado]_{ISF}$ a jelenleg alkalmazott módszerekkel meglehetősen nagy bizonytalansággal határozható meg, különösen szembevetve ez az eltérő módszerekkel becsült adatok összevetésekor (1. táblázat).

Az $[Ado]_{ISF}$ és az ebben beállt változások meghatározásával kapcsolatos bizonytalanság megoldását új módszerek kifejlesztésében látjuk. Célunk olyan módszer kifejlesztése volt, amely a Langmuir-Hill egyenletben rögzített összefüggés alapján képes az $[Ado]_{ISF}$ változásának kvantifikálására. A Langmuir-Hill egyenlet bomlékony anyagok meghatározására nem alkalmas, de stabil agonisták koncentrációját receptoruk közelében meg lehet a segítségével becsülni valamely pontosan mérhető hatásuk alapján. Kiinduló megfigyelésünk szerint, ha egy $E/[A]$ görbe felvétele előtt a használni kívánt agonistából adunk a rendszerhez, az dóziszfüggően csökkenti a $E/[A]$ görbe által detektált válaszkésztséget az adott agonistával szemben. Ez alapján olyan egyenletet fejlesztettünk ki, amely regressziós függvényként egy vizsgált rendszer $E/[A]$ görbéjének pontjaira illesztve egyetlen értékkel megadja a vizsgált $E/[A]$ görbe

eltérését egy az egyenletben definiált $E/[A]$ görbétől (ld.: „koncentráció-meghatározó” egyenlet, Eredmények). Ezt a viszonyítási alapot az egyenletbe írt $E_{\max}$, EC_{50} és n_H paraméterek hordozzák. Legcélszerűbb az adott rendszer intakt állapotában felvett $E/[A]$ görbe paramétereit megadni, melyek révén a fiziológiás állapothoz hasonlítunk. Az ettől való eltérést az egyenlet illesztése a $E/[A]$ görbe felvételéhez használt agonista azon koncentrációjával adja meg, amely az intakt rendszerhez adva annak válaszkészségét hasonlóra változtatná, mint az általunk vizsgált rendszeré. Módszerünk alkalmasnak bizonyult az ismert koncentrációban a pitvarokhoz mért stabil A_1 receptor agonista CPA koncentrációjának nagy pontossággal való meghatározására CPA-val felvett $E/[A]$ görbe felhasználásával, amelyre a „koncentráció-meghatározó” egyenletet illesztettük (12. ábra; 5. táblázat). Sőt, az előzetesen bemért CPA dózist muszkarinerg agonista MC-nal kivitelezett $E/[A]$ görbe segítségével is sikerült hasonlóan pontosan megbecsülni (5. táblázat). Ennek oka a pitvari A_1 Ado és M_2 acetilkolin receptorok nagymértékben átfedő posztreceptorális jelátvitelében keresendő ($K_{ACh/Ado}$ nyitás, AC gátlás). A MC előzetesen bemért dózisát viszont csak nagyon pontatlanul tudtuk meghatározni. Ennek oka az volt, hogy a MC elég stabilnak bizonyult precíz $E/[A]$ görbe készítéséhez (a bemért dózis hatása gyorsan kialakult és utána percekig nem változott), de meghatározandó anyagként a vizsgálat kb. 30 perces ideje alatt már észrevehetően bomlott. A VERA hatáskifejlődése olyan elhúzódó volt, hogy eljárásunk alkalmatlannak mutatkozott a meghatározására (5. táblázat). Módszerünket „receptorális válaszkészség módszer”-nek (receptorial responsiveness method; RRM) neveztük el.

Feltételezésünk szerint az RRM alkalmas az élő szövetben instabil agonisták koncentrációváltozásának jellemzésére is, mivel nem követeli meg a meghatározandó és a meghatározás során felvett $E/[A]$ görbéhez használt anyag egyezését (5. táblázat). Jelenleg nincs megbízható módszer a cardialis $[Ado]_{ISF}$ mérésére, amit a rá vonatkozó becslések széles spektruma is jelez (1. táblázat). Mivel a hatás szempontjából elsősorban az A_1 receptorok közvetlen környezetének Ado koncentrációja fontos, az $[Ado]_{ISF}$ változásának jellemzése az RRM segítségével különösen informatívnak ígérkezik. Ehhez szükség van két $E/[A]$ görbe felvételére egy stabil, az élő szövetben nem vagy csak lassan eliminálódó A_1 receptor agonistával. Az egyik $E/[A]$ görbének intakt körülmények között kell készülnie, az erre illesztett Langmuir-Hill egyenlet paraméterei ($E_{\max}$,

EC_{50} és n_H) fogják definiálni az intakt $E/[A]$ kapcsolatot, miután beírásra kerülnek a „koncentráció-meghatározó” egyenletbe. A másik $E/[A]$ görbét ugyanolyan körülmények között kell felvenni ugyanazon (illetve, ha ez nem lehetséges, egy ugyanolyan jellegű) biológiai rendszerben, de már az $[Ado]_{ISF}$ változása után (pl. az ezt előidéző NT blokádnak létrehozását követően). Az $[Ado]_{ISF}$ változásának RRM-mel való jellemzéséhez a következő feltételeket teljesítése szükséges:

1. Az $E/[A]$ görbéhez alkalmazott agonista ne eliminálódjon és ne kompartmentalizálódjon jelentős mértékben a szövetben, továbbá használja döntően a jellemzendő agonista receptorának szignáltranszdukcióját. – Az A_1 receptor agonista CPA vértelen *in vitro* körülmények között relatíve stabil (Gesztelyi és mtsai, 2004), ezért alkalmas vegyület, de vér jelenlétében felgyorsul a bomlása (Pavan és IJzerman, 1998). A CHA véres körülmények között is stabil A_1 receptor agonista (Pavan és IJzerman, 1998).

2. A megváltozott $[Ado]_{ISF}$ legyen viszonylag állandó a vizsgálat alatt (30-50 perc). – Tapasztalatunk szerint a CPA negatív inotrop hatása ennyi ideig kellően stabil tengerimalac pitvaron.

3. Az érintett receptor ne deszenzitizálódjon a vizsgálat alatt. – Ezt a feltételt az A_1 receptor teljesíti, csak órák alatt deszenzitizálódik jelentős mértékben (Baker és mtsai, 2000).

Az RRM a cardialis $[Ado]_{ISF}$ változását azzal a CPA (vagy más stabil A_1 receptor agonista) koncentrációval jellemzi, amelyik a mért kimenet (pl. kontrakciós erő) alapján ekvivalens (ekvиеffektív) a receptorközelbeli Ado-szint változásával. Ilyen meghatározásra érdemes jelenség például a NT blokádnak. Ma már általánosan elfogadott, hogy a NT gátlása döntően az $[Ado]_{ISF}$ változtatásán (normoxiában: növelésén) keresztül fejt ki hatását (Deussen, 2000a, b), és ezen keresztül potenciózza az Ado hatásait (De Jong és mtsai, 2000; Keeling és mtsai, 2000). Egy a jelen értekezéshez fel nem használt, az RRM-mel végzett meghatározásunk szerint a NT blokkolása 8 napig T_4 kezelt tengerimalacok bal pitvarán akkora növekedést eredményezett az $[Ado]_{ISF}$ -ben, ami 46.5 ± 13.7 nM CPA koncentrációval ekvиеffektív (inotrop hatás tekintetében). Ugyanez az érték S kezelt pitvarokon 18.8 ± 3 nM CPA volt, a T_4 kezelés tehát fokozta a NT gátlás $[Ado]_{ISF}$ növelő hatását.

4.5 Általános következtetések

Egy kutatómunka részleges befejezése egy olyan összegzéssel kell, hogy záruljon, amely részben meghatározza a kísérletek során nyert adatok beilleszthetőségét egy adott biológiai rendszerbe, továbbá megpróbál olyan távlati célokat is felvázolni, amelynek révén a kísérleti eredmények során felvetett problémák tökéletesebb megoldást nyerhetnek.

A jelen disszertációban vázolt eredmények alapján megfogalmazható, hogy a thyreoid státusz és az adenosin receptorhatás között figyelemreméltó összefüggések vannak. A T_4 kezelés tengerimalac pitvarizomzaton egyértelműen csökkenti az A_1 receptorválaszokat, valamint speciális körülmények között tettenérhetően (ADA gátlás) fokozza az intracelluláris P-site mechanizmusokat.

Közismert, hogy a hyperthyreosis többek között fokozza az adrenerg β -receptor denzitást, valamint ezen receptorok érzékenységét, ennek összes klinikai konzekvenciájával együtt. Ismeretes ugyanakkor az is, hogy az Ado, valamint az extracelluláris Ado receptorokon ható adenosin analógok és P-site aktivátorok csökkentik az AC aktiválásával ható endogén anyagok (noradrenalin, hisztamin, dopamin, stb.) myocardialis hatásait. Ha ezen adatokat összevetjük saját kísérleti eredményeinkkel, akkor jogosnak látszik az a feltételezés, hogy a T_4 tartós jelenléte egy olyan regulációs folyamatot indít el a myocardialis rostokon, amelynek eredményeként módosulnak a catecholamin hatások.

(1) Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a fölös T_4 hatására felgyorsult anyagcserefolyamatok a szöveti Ado koncentráció emelkedésével járnak (jelenlegi RRM vizsgálataink is erre utalnak). Ez az Ado koncentráció növekedés feltehetően mérsékli a catecholaminok β -adrenerg hatásait. (2) A T_4 jelenléte adataink szerint csökkenti az Ado-ra adott választ, tehát joggal feltételezhető, hogy ez a catecholaminok β -adrenerg hatását erősíti, hiszen kiesik – vagy legalábbis mérséklődik – az endogén Ado gátló hatása. Ilyen módon a T_4 egyrészt végrehajtja a már ismert β -adrenerg receptor upregulációt, másrészt a β -receptor szenzitizációt. Kísérleteink alapján feltételezzük, hogy ebben az érzékenységfokozódásban a csökkent Ado válaszkészségnek szerepe lehet. (3) Irodalmi adatok szerint a P-site agonisták is rendelkeznek catecholamin hatást gátló effektussal, tehát elképzelésünk szerint az általunk feltételezett P-site

upreguláció abban az esetben fogja csökkenteni a catecholamin hatást, amikor a hyperthyreosis miatt bekövetkező fokozott szív működés inkongruenciát teremt a szív oxigénellátása és oxigénfogyasztása között. Mivel munkacsoportunk korábbi eredményei szerint a hypoxia jelentősen csökkenti az ADA aktivitását, ez azt eredményezheti, hogy a hypoxiás körülmények között felszaporodó Ado az intracelluláris kötőhelyek aktiválásával (azaz az AC gátlásával) csökkenti a túlméretezett β -adrenerg stimulációt.

Amennyiben ez a feltételezésünk igaznak bizonyulna, akkor ez az adenozinerg mechanizmus megfelelő alapot adna a T_4 szívhatásainak, különösen a β -adrenerg receptorokon mediálódó cardialis hatások értelmezéséhez.

Ennek az elképzelésünknek a további vizsgálata határozza meg jövőbeli kutatási céljainkat, hogy ezáltal ennek az érdekes és mindmáig kellőképpen nem tisztázott problémának a megoldásához – a megfelelő modern biokémiai és molekuláris biológiai technikák igénybevételével – közelebb kerüljünk.

6. Összefoglalás

Az Ado hatás extra- és intracelluláris komponensének elkülönítését és a T_4 kezelés rájuk kifejtett hatásának összehasonlítását célzó vizsgálataink főbb megállapításai a következők voltak: (1.) A 8 napos T_4 kezelés szignifikánsan csökkentette az Ado és az extracelluláris támadáspontú szintetikus Ado receptor agonisták negatív inotrop hatását tengerimalac bal pitvaron, mind az E_{max} csökkentése, mind a pD_2 ($-\log EC_{50}$) növelése útján. (2.) Az intracelluláris ADA CF és EHNA általi gátlása nagyobb mértékben növelte az Ado receptor agonisták hatását a T_4 kezelt pitvarokon, mint az S kezelteken. (3.) A P-site aktivátorok negatív inotrop hatása eleve kisebb volt, mint az Ado receptor agonistáké, de a T_4 kezelés ebben is csökkenést hozott létre. (4.) A P-site aktivátorok hatását az ADA gátlása drámai módon fokozta. A T_4 kezelt pitvarokon nemcsak a potenciáció volt nagyobb, de a P-site aktivátorok hatása abszolút mértékben is meghaladta az euthyreoid pitvarokon megfigyeltet. Mindezek arra utalnak, hogy a T_4 kezelés az adozinerg szignalizációnak az euthyreoid állapotban domináns extracelluláris támadáspontú komponensét csökkenti, az intracellulárisat viszont inkább növeli, mely utóbbi hatás azonban csak a hyperthyreosisban feltehetően fokozott ADA aktivitás elnyomása után manifesztálódik.

Az ADA és a NT gátlás következményeinek tengerimalac bal pitvaron való összehasonlítása a következő megállapításokhoz vezetett: (1.) Az ADA és a NT gátlása egyaránt fokozza az exogén Ado hatékonyságát tengerimalac bal pitvaron. Az ADA gátlása azonban, szemben a NT blokkolásával, nemcsak a pD_2 -t érintette, hanem fokozta a E_{max} -ot is. (2.) Az ADA gátlás erőteljesebben fokozta az Ado-ra adott választ hyperthyreoid pitvarokon az euthyreoidokhoz képest, összhangban az előző vizsgálat sorozatban kapott eredményeinkkel. Ezzel szemben az NT gátlása nem okozott ilyen különbséget az S és a T_4 kezelt pitvarok Ado $E/[A]$ görbéi között. (3.) Az intracelluláris foszfatazok fontos szerepet játszanak az ADA gátlás ezen különleges hatásának kialakításában, míg a SERCA-PLB rendszer részvétele ebben alárendelt. Következésképp, mivel az ADA gátlása elsődlegesen az intracelluláris Ado koncentrációját emeli, a Ezen túlmenően elképzelhető, hogy

már önmagában az endogén Ado ADA katalizálta lebontásának gátlása is fokozza az adenozinerg mechanizmusok hatékonyságát, amely hatás kifejezettebben jelentkezett hyperthyreoid állapotban.

Az EHNA-val folytatott kísérleteink demonstrálták a PDE_2 gátlásának eltérő inotrop következményét S illetve T_4 kezelt tengerimalac bal pitvaron. A PDE_2 gátlás pozitív inotrop hatása nehezen ítéltető meg euthyreoid állapotban, mivel az EHNA, a leggyakrabban alkalmazott szelektív PDE_2 inhibitor (a PDE gátlók között), egyben erős ADA gátló is, a megemelkedett szöveti Ado-szint cAMP csökkentő hatása pedig elfedi a PDE_2 gátlás cAMP növelő működését. Vizsgálataink kimutatták, hogy az EHNA erőteljesebben potencírozta a CPA negatív inotrop hatását T_4 kezelt pitvaron, mint S kezeltben. A PDE_2 gátlás ezen hatásának szinergiáját a thyreoid hormonok hatásával feltehetően az L-típusú Ca^{2+} csatornákra konvergáló stimuláló jelátviteli útjaik hozzák létre. Az EHNA hatásában azonban nem hagyhatjuk figyelmen kívül az ADA bénítását, ami hozzájárulhat a hyperthyreoid pitvarokon a CPA-ra adott válasz potencírozásához az előző vizsgálatsorozatban felvetett mechanizmus révén, mely szerint az ADA gátlása hyperthyreoid pitvarszövetben jobban fokozza az adenozinerg jelátvitel hatékonyságát, mint S kezeltben.

A receptoriális válaszkészség módszer (RRM) koncentráció-változás becslésére szolgáló eljárás valamely receptoriális hatás és az intakt állapotot leíró E_{max} , EC_{50} , n_H paraméterek alapján. Jelentőségét abban látjuk, hogy lehetővé teszi a receptorközei koncentráció jellemzését azokban az esetekben is, amikor a hatóanyag bomlékonysága miatt a Langmuir-Hill egyenlet erre a célra nem alkalmas. Ezt az teszi lehetővé, hogy az RRM nem követeli meg a meghatározandó anyag és a $E/[A]$ görbe felvételéhez használt agonista egyezését. Vagyis, bomlékony és erősen kompartmentalizálódó anyagok (mint például az Ado) más módon gyakorlatilag mérhetetlen receptorközei koncentrációváltozását stabil, jól diffundáló és azonos illetve nagyon hasonló jelátvitelű szerek (mint például a CPA) koncentrációival jellemezhetjük. Az RRM segítségével kimutattuk, hogy a T_4 kezelés fokozta a NT gátlás $[Ado]_{ISF}$ növelő hatását izolált tengerimalac bal pitvaron.

7. Irodalom

Agarwal RP (1980) In vivo inhibition of adenosine deaminase by 2'-deoxycoformycin in mouse blood and leukemia L 1210 cells. *Biochem Pharmacol* 29: 743-754

Alexander SPH, Mathie A, Peters JA (2001a) TiPS Nomenclature Supplement 2001. *Trends Pharmacol Sci* 22 (Suppl. 1): 13-14

Alexander SPH, Mathie A, Peters JA (2001b) TiPS Nomenclature Supplement 2001. *Trends Pharmacol Sci* 22 (Suppl. 1): 138

Arai M, Otsu K, MacLennan DH, Alpert NR, Periasamy M (1991) Effect of thyroid hormone on the expression of mRNA encoding sarcoplasmic reticulum proteins. *Circ. Res* 69 (2): 266-276

Bak MI, Ingwall JS (1998) Regulation of cardiac AMP-specific 5'-nucleotidase during ischemia mediates ATP resynthesis on reflow. *Am J Physiol* 274: C992-1001

Baker SP, Scammells PJ, Belardinelli L (2000) Differential A₁-adenosine receptor reserve for inhibition of cyclic AMP accumulation and G-protein activation in DDT(1) MF-2 cells. *Br J Pharmacol* 130: 1156-1164

Belardinelli L, Linden J, Berne RM (1989) The cardiac effects of adenosine. *Progr Cardiovasc Dis* 32: 73-97

Belardinelli L, Shryock JC., Song Y, Wang D, Srinivas M (1995) Ionic basis of the electrophysiological actions of adenosine on cardiomyocytes. *FASEB J* 9: 359-365

Berne RM (1963) Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am J Physiol* 204: 317-322

Bers DM (2001) Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force (második kiadás). *Developments in Cardiovascular Medicine* Vol. 237, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Bottinelli R, Canepari M, Cappelli V, Reggiani C (1995) Maximum speed of shortening and ATPase activity in atrial and ventricular myocardia of hyperthyroid rats. *Am J Physiol* 269 (3 Pt 1): C785-90

Bumgarner JR, Ramkumar V, Stiles GL (1989) Altered thyroid status regulates the adipocyte A₁ adenosine receptor system. *Life Sci* 44 (22): 1705-1712.

Burnstock G (1976) Purinergic receptors. *J Theor Biol* 62: 491-503

Burnstock G (1978) A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Cell membrane receptors for drugs and hormones (szerk.: Bolis L és Straub RW), Raven Press, New York: 107-118

Carneiro-Ramos MS, da Silva VB, Coutinho MB Jr, Battastini AM, Sarkis JJ, Barreto-Chaves ML (2004) Thyroid hormone stimulates 5'-ecto-nucleotidase of neonatal rat ventricular myocytes. *Mol Cell Biochem* 265 (1-2): 195-201

Carr AN, Kranias EG (2002) Thyroid hormone regulation of calcium cycling proteins. *Thyroid* 12(6): 453-457

Cernohorsky J, Kolar F, Pelouch V, Korecky B, Vetter R (1998) Thyroid control of sarcolemmal Na⁺/Ca²⁺ exchanger and SR Ca²⁺-ATPase in developing heart. *Am J Physiol* 275 (1Pt2): H264-273

Cobbin LB, Einstein R, McGuire MH (1974) Studies on the coronary dilatator actions of some adenosine analogues. *Br J Pharmacol* 50: 25-33

Conant AR, Jarvis SM (1994) Nucleoside influx and efflux in guinea-pig ventricular myocytes. Inhibition by analogues of lidoflazine. *Biochem Pharmacol* 48: 873-880.

Conti JB, Belardinelli L, Utterback DB, Curtis AB (1995) Endogenous adenosine is an antiarrhythmic agent. *Circulation* 91: 1761-1767

Cornfield LJ, Hu S, Hurt SD, Sills MA (1992) [³H]2-phenylaminoadenosine ([³H]CV 1808) labels a novel adenosine receptor in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 263 (2): 552-561

De Jonge R, Out M, Maas WJ, De Jong JW (2002) Preconditioning of rat hearts by adenosine A₁ or A₃ receptor activation. *Eur J Pharmacol* 441 (3): 165-72

De Jong JW, De Jonge R, Keijzer E, Bradamante S (2000) The role of adenosine in preconditioning. *Pharmacol Therapeut* 87: 141-149

Dekanski D, Piperski V, Tasic J, Markovic ID, Jokanovic M, Stukalov P, Mitrovic DM (2004) Transport of endogenous nucleosides in guinea pig heart. *Can J Physiol Pharmacol* 82: 1061-1067.

Deussen A, Stappert M, Schafer S, Kelm M (1999) Quantification of extracellular and intracellular adenosine production: understanding the transmembranous concentration gradient. *Circulation* 99: 2041-2047

Deussen A (2000a) Metabolic flux rates of adenosine in the heart. *N-S Arch Pharmacol* 362: 351-363.

Deussen A (2000b) Quantitative integration of different sites of adenosine metabolism in the heart. *Ann Biomed Eng* 28: 877-883.

Drury AN, Szent-Györgyi A (1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol (London)* 68: 213-237

El-Ani D, Jacobson KA, Shainberg A (1994) Characterization of adenosine receptors in intact cultured heart cells. *Biochem Pharmacol* 48 (4): 727-735

Fazekas T (1999) Egy reneszánszát élő endogén anti-tachyarrhythmias anyag, az adenosin szív-elektrofiziológiai hatásai és klinikai alkalmazása. *Cardiol Hung* 28 (Suppl 1): 28-38

Fideu MD, Miras-Portugal MT (1992) Long term regulation of nucleoside transport by thyroid hormone (T_3) in cultured chromaffin cells. *Neurochem Res* 17 (11): 1099-1104

Fideu MD, Arce A, Esquifino AI, Miras-Portugal MT (1994) Thyroid hormones modulate both adenosine transport and A_1 receptors in rat brain. *Am J Physiol* 267 (6 pt 1): C1651-1656

Ford WR, Broadley KJ (1999) Effects of K^+ -channel blockers on A_1 -adenosine receptor-mediated negative inotropy and chronotropy of guinea-pig isolated left and right atria. *Fundam Clin Pharmacol* 13: 320-329

Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53: 527-552

Gardner NM, Broadley KJ (1999) Analysis of the atypical characteristics of adenosine receptors mediating negative inotropic and chronotropic responses of guinea-pig isolated atria and papillary muscles. *Br J Pharmacol* 127: 1619-1626

Gidday JM, Kaiser DM, Rubio R, Berne RM (1992) Heterogeneity and sampling volume dependence of epicardial adenosine concentrations. *J Mol Cell Cardiol* 24: 351-364

Goldenthal MJ, Weiss HR, Marin-Garcia J (2004) Bioenergetic remodeling of heart mitochondria by thyroid hormone. *Mol Cell Biochem* 265 (1-2): 97-106

Gøtzsche LB (1994) L-triiodothyronine acutely increases Ca²⁺ uptake in the isolated, perfused rat heart. Changes in L-type Ca²⁺ channels and beta-receptors during short- and long-term hyper- and hypothyroidism. *Eur J Endocrinol* 130: 171-179

Gupta RC, Neumann J, Watanabe AM (1993) Comparison of adenosine and muscarinic receptor-mediated effects on protein phosphatase inhibitor-1 activity in the heart. *J Pharmacol Exp Ther* 266: 16-22

Han C, Yu G, Zhang Y, Xu K, Qu P, Dong E (1995) Alterations of α_1 -adrenoceptor subtypes in the hearts of thyroxine-treated rats. *Eur J Pharmacol* 294: 593-599

Headrick JP, Hack B, Ashton KJ (2003) Acute adenosinergic cardioprotection in ischemic-reperfused hearts. *Am J Physiol* 285: H1797-1818.

Hutchinson SA, Scammells PJ (2004) A₁(1) adenosine receptor agonists: medicinal chemistry and therapeutic potential. *Curr Pharm Des* 10: 2021-2039.

Ishac EJ, Pennefather JN (1983) The effects of altered thyroid state upon responses mediated by atrial muscarinic receptors in the rat. *Br J Pharmacol* 79 (2): 451-459.

Jahnel U, Nawrath H., Ochi R (1992) Adrenoceptor-mediated effects on calcium channel currents are antagonized by 5'-(N-ethyl)-carboxamido-adenosine in guinea-pig atrial cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 345: 564-569

Kaasik A, Minajeva A, Paju K, Eimre M, Seppet EK (1997a) Thyroid hormones differentially affect sarcoplasmic reticulum function in rat atria and ventricles. *Mol Cel Biochem* 176: 119-126

Kaasik A, Paju K, Vetter R, Seppet EK (1997b) Thyroid hormones increase the contractility but suppress the effects of beta-adrenergic agonist by decreasing phospholamban expression in rat atria. *Cardiovasc Res* 35: 106-112

Kaasik A, Seppet EK, Ohisalo JJ (1994) Enhanced negative inotropic effect of an A₁-receptor agonist in rat left atria in hypothyroidism. *J Mol Cell Cardiol* 26: 509-517

Kadenbach B (2003) Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1604 (2): 77-94

- Keeling IM, Obermayr RP, Schneider B, Spieckermann PG (2000) Postischemic cardiac function recovery in the isolated rat heart: effects of adenosine deaminase and nucleoside transport inhibition. *Langenbecks Arch Surg* 385: 531-537.
- Kekesi V, Zima E, Barat E, Huszar E, Nagy A, Losonczy L, Merkely B, Horkay F, Juhasz-Nagy A (2002) Pericardial concentrations of adenosine, inosine and hypoxanthine in an experimental canine model of spastic ischaemia. *Clin Sci* 103 (Suppl 48): 198S-201S
- Kingsley GB, Tager HS (1979) Standard methods in Clinical Chemistry. In: Klinikai Kémiai Módszertani Gyűjtemény. OTKI-OLI, Budapest
- Kiss E, Jakab G, Kranias EG, Edes I (1994) Thyroid hormone-induced alterations in phospholamban protein expression. Regulatory effects on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport and myocardial relaxation. *Circ Res* 75 (2): 245-251
- Klein I, Ojamaa K (2001) Thyroid hormone - targeting the heart. *Endocrinology* 142: 11-12
- Kreuzberg U, Theissen P, Schicha H, Schroder F, Mehlhorn U, de Vivie ER, Boknik P, Neumann J, Grohe C, Herzig S (2000) Single-channel activity and expression of atrial L-type Ca²⁺ channels in patients with latent hyperthyroidism. *Am J Physiol* 278: H723-730
- Kroll K, Stepp DW (1996) Adenosine kinetics in canine coronary circulation. *Am J Physiol* 270: H1469-1483
- Kunos G (1977) Thyroid hormone-dependent interconversion of myocardial alpha- and beta-adrenoceptors in the rat. *Br J Pharmacol* 59(1): 177-189
- Kurachi Y, Nakajima T, Sugimoto T (1986) On the mechanism of activation of muscarinic potassium channels by adenosine in isolated atrial cells: Involvement of GTP-binding proteins. *Pflügers Arch* 407: 264-274
- Laxson DD, Homans DC, Bache RJ (1993) Inhibition of adenosine-mediated coronary vasodilation exacerbates myocardial ischemia during exercise. *Am J Physiol* 265: H1471-H1477
- Linden J (2005) Adenosine in Tissue Protection and Tissue Regulation. *Mol Pharmacol* 67: 1385-1387

Mager S, Palti Y, Binah O (1992) Mechanism of hyperthyroidism-induced modulation of the L-type Ca²⁺ current in guinea pig ventricular myocytes. *Pflügers Arch* 421: 425-430

Malbon CC, Rapiejko PJ, Mangano TJ (1985) Fat cell adenylate cyclase system. Enhanced inhibition by adenosine and GTP in the hypothyroid rat. *J Biol Chem* 260(4): 2558-2564

Meghji P, Middleton K, Hassall CJ, Phillips MI, Newby AC (1988) Evidence for extracellular deamination of adenosine in the rat heart. *Int J Biochem* 20(12): 1335-1341

Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74: 1124–1136

Neumann J, Gupta RC, Jones LR, Bodor GS., Bartel S, Krause EG, Pask HT, Schmitz W, Scholz H, Watanabe AM (1995) Interaction of beta-adrenoceptor and adenosine receptor agonists on phosphorylation. Identification of target proteins in mammalian ventricles. *J Mol Cell Cardiol* 27: 1655-1667

Ojamaa K, Kenessey A, Klein I (2000a) Thyroid hormone regulation of phospholamban phosphorylation in the rat heart. *Endocrinology* 141: 2139-2144

Ojamaa K, Klein I, Sabet A, Steinberg SF (2000b) Changes in adenylyl cyclase isoforms as a mechanism for thyroid hormone modulation of cardiac beta-adrenergic receptor responsiveness. *Metabolism* 49 (2): 275-279

Pantos C, Malliopoulou V, Varonos DD, Cokkinos DV (2004) Thyroid hormone and phenotypes of cardioprotection. *Basic Res Cardiol* 99: 101-120.

Pavan B, IJzerman AP (1998) Processing of adenosine receptor agonists in rat and human whole blood. *Biochem Pharmacol* 56: 1625-1632

Pearl J, Willems L, Headrick JP (2003) Receptor and non-receptor-dependent mechanisms of cardioprotection with adenosine. *Am J Physiol* 284: H519-527.

Pracyk JB, Slotkin TA (1991) Thyroid hormone differentially regulates development of beta-adrenergic receptors, adenylate cyclase and ornithine decarboxylase in rat heart and kidney. *J Dev Physiol* 16 (4): 251-261

Queiroz MS, Shao Y, Berkich DA, Lanoue KF, Ismail-Beigi F (2002) Thyroid hormone regulation of cardiac bioenergetics: role of intracellular creatine. *Am J Physiol* 283 (6): H2527-2533

Rapiejko PJ, Malbon CC (1987) Short term hyperthyroidism modulates adenosine receptors and catalytic activity of adenylate cyclase in adipocytes.

Biochem J 241: 765-771

Rivet-Bastide M, Vandecasteele G, Hatem S, Verde I, Benardeau A, Mercadier JJ, Fischmeister R (1997) cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase regulates the basal calcium current in human atrial myocytes.

J Clin Invest 99: 2710-2718

Rogler-Brown T, Agarwal RP, Parks RE Jr (1978) Tight-binding inhibitors. VI. Interactions of deoxycoformycin and adenosine deaminase in intact human erythrocytes and Sarcoma 180 cells. *Biochem Pharmacol* 27: 2289-2296

Rosenthal RA, Lowenstein JM (1991) Inhibition of phosphorylation of troponin I in rat heart by adenosine and 5'-chloro-5'-deoxyadenosine. *Biochem Pharmacol* 42: 685-692

Rubinstein I, Binah O (1989) Thyroid hormone modulates membrane currents in guinea-pig ventricular myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 340: 705-711

Schrader WP, West CA (1990) Localization of adenosine deaminase and adenosine deaminase complexing protein in rabbit heart. Implications for adenosine metabolism. *Circ Res* 66(3): 754-762

Schreieck J, Richardt G (1999) Endogenous adenosine reduces the occurrence of ischaemia-induced ventricular fibrillation in rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 31: 123-134

Schutz W, Schrader J, Gerlach E (1981) Different sites of adenosine formation in the heart. *Am J Physiol* 240: H963-970

Seppet EK, Kaasik A, Minajeva A, Paju K, Ohisalo JJ, Vetter R, Braun U (1998) Mechanism of thyroid hormone control over sensitivity and maximal contractile responsiveness to beta-adrenergic agonists in atria. *Mol Cell Biochem* 184 (1-2): 419-426

Seppet EK, Kolar F, Dixon IM, Hata T, Dhalla NS (1993) Regulation of cardiac sarcolemmal Ca^{2+} channels and Ca^{2+} transporters by thyroid hormone. *Mol Cell Biochem* 129: 145-159

Shenoy R, Klein I, Ojamaa K (2001) Differential regulation of SR calcium transporters by thyroid hormone in rat atria and ventricles. *Am J Physiol* 281: H1690-1696

Shirayama T, Pappano AJ (1996) Biphasic effects of intrapipette cyclic GMP on L-type calcium current and contraction of guinea pig ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 279: 1274-1281

Shryock JC, Belardinelli L (1997) Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am J Cardiol* 79: 2-10

Smolenski RT, Yacoub MH, Seymour AM (1995) Hyperthyroidism increases adenosine transport and metabolism in the rat heart. *Mol Cell Biochem* 143: 143-149.

Sommerschild HT, Kirkebøen KA (2000) Adenosine and cardioprotection during ischaemia and reperfusion – an overview. *Acta Anaesthesiol Scand* 44: 1038-1055

Stepp DW, Van Bibber R, Kroll K, Feigl EO (1996) Quantitative relation between interstitial adenosine concentration and coronary blood flow. *Circ Res* 79 (3): 601-610

Szentmiklosi AJ, Cseppento A, Szabo JZ, Nosztray K, Szegi J (1992) Myocardial and vascular actions of purinoceptor activators are reduced after thyroxine treatment. *Pharmacol Res* 25 (Suppl. 2): 171-172

Szentmiklosi AJ, Kovacs T, Cseppento A, Szegi J (1983) On the possible mechanisms underlying the inhibitory action of adenosine (AR) in atrial myocardium of guinea pigs. In: *Regulatory Function of Adenosine*. Szerkesztők: Berne RM, Rall TW, Rubio R. Martinus Nijhoff Publishers, Boston: 543

Szentmiklosi AJ, Nemeth M, Cseppento A, Szegi J, Papp JG, Szekeres L (1982) Potentiation of the myocardial actions of adenosine in the presence of coformycin, a specific inhibitor of adenosine deaminase. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 256: 236-252

Takacs IE, Szabo J, Nosztray K, Szentmiklosi AJ, Cseppento A, Szegi J (1985) Alterations of contractility and sarcoplasmic reticulum function of rat heart in experimental hypo- and hyperthyroidism. *Gen Physiol Biophys* 4(3): 271-278

Tesmer JJ, Dessauer CW, Sunahara RK, Murray LD, Johnson RA, Gilman AG, Sprang SR (2000) Molecular basis for P-site inhibition of adenylyl cyclase. *Biochemistry* 39: 14464-14471

Thorn JA, Jarvis SM (1996) Adenosine transporters. *Gen Pharmacol* 27: 613-620

Tune JD, Richmond KN, Gorman MW, Feigl EO (2002) Control of coronary blood flow during exercise. *Exp Biol Med* (Maywood) 227 (4): 238-250

Tosaki A (1995) Reperfusion-induced arrhythmias: control and mechanisms. Akadémiai Kiadó, Budapest

Tsai BM, Wang M, March KL, Turrentine MW, Brown JW, Meldrum DR (2004) Preconditioning: evolution of basic mechanisms to potential therapeutic strategies. *Shock* 21 (3):195-209

Van Belle H (1993) Nucleoside transport inhibition: A therapeutic approach to cardioprotection via adenosine? *Cardiovasc Res* 27: 68-76

Vandecasteele G, Verde I, Rucker-Martin C, Donzeau-Gouge P, Fischmeister R (2001) Cyclic GMP regulation of the L-type Ca²⁺ channel current in human atrial myocytes. *J Physiol* (Published by Cambridge University Press) 533: 329-340

Van Rossum JM (1963) Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 143: 299-330

Van Wylen DG, Willis J, Sodhi J, Weiss RJ, Lasley RD, Mentzer RM Jr (1990) Cardiac microdialysis to estimate interstitial adenosine and coronary blood flow. *Am J Physiol* 258: H1642-1649

Vaughan Williams EM, Somberg JC (1998) Control of cardiac rhythm. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia-New York, 78-79

Waisberg M, Shainberg A (1992) Characterization of muscarinic cholinergic receptors in intact myocardial cells in vitro. *Biochem Pharmacol* 43 (11): 2327-2334

Wang T, Mentzer RM Jr, Van Wylen DG (1992) Interstitial adenosine with dipyridamole: effect of adenosine receptor blockade and adenosine deaminase. *Am J Physiol* 263: H552-558

Wink MR, Tamajusuku AS, Braganhol E, Casali EA, Barreto-Chaves ML, Sarkis JJ, Battastini AM (2003) Thyroid hormone upregulates ecto-5'-nucleotidase/CD73 in C6 rat glioma cells. *Mol Cell Endocrinol* 205 (1-2): 107-114

Wilbur SL, Marchlinski FE (1997) Adenosine as an antiarrhythmic agent. *Am J Cardiol* 79 (12A): 30-37

Zhang J, Lazar MA (2000) The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu Rev Physiol* 62: 439-466

8. Saját közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló munkák

Gesztelyi R, Zsuga J, Bajza Á, Cseppentő Á, Szabó JZ, Szentmiklósi AJ (2003a) Special sensitization pattern in adenosine-induced myocardial responses after thyroxine treatment. *J Pharmacol Sci* 91 (4): 295-304 (IF: 1.419)

Gesztelyi R, Zsuga J, Hajdú P, Szabó JZs, Cseppentő Á, Szentmiklósi AJ (2003b) 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* 22: 501-513 (IF: 0.794)

Gesztelyi R, Zsuga J, Juhász B, Dér P, Vecsernyés M, Szentmiklósi AJ (2004) Concentration estimation via curve fitting: quantification of negative inotropic agents by using a simple mathematical method in guinea pig atria. *Bull Math Biol* 66 (5): 1439-1453 (IF: 1.485)

Egyéb munkák:

Gesztelyi R, Fekete I, Kellermann M, Csiba L, Bereczki D (1999) Screening for depression among post-stroke outpatients in Eastern Hungary. *J Geriatr Psych Neur* 12: 194-199 (IF: 0.881)

Kellermann M, Fekete I, **Gesztelyi R**, Kollár J, Sikula J, Csiba L, Bereczki D (1999) Screening for depressive symptoms in the acute phase of stroke. *Gen Hosp Psychiat* 21: 116-121 (IF: 1.4)

Körtvély Á, Szigeti G, **Gesztelyi R**, Zsuga J, Bányász T, Magyar J, Szigligeti P, Kovács L, Jednákovits A, Szentmiklósi AJ, Nánási PP (2000) Cardiovascular effects of BRX-005: comparison to bimocloamol. *Life Sci* 67: 1783-1789 (IF: 1.808)

Kellermann M, **Gesztelyi R**, Kovács A, Bereczki D (2001) Post-stroke depresszió – irodalmi áttekintés. *Psychiat Hung* 16 (4): 407-417

Zsuga J, Pórszász R, **Gesztelyi R**, Németh J, Szolcsányi J, Szilvássy Z, Paragh G, Kovács P (2003) A hepatikus inzulin szenzitizáció mechanizmus szenzoros nitrerg jellege éber nyulakon. *Metabolizmus* I. évfolyam 1. szám 57-59

Rubovszky B, Szentmiklósi AJ, Márián T, Cseppentő Á, **Gesztelyi R**, Székely A, Fórizs F, Gáspár R, Krasznai Z (2003) Comparative pharmacological studies on the A2 adenosine receptor agonist 5'-n-ethyl-carboxamidoadenosine (NECA) and its F¹⁹ isotope labelled derivative (FNECA). *J Pharmacol Sci* 93 (3): 356-363 (IF: 1.419)

Zsuga J, **Gesztelyi R**, Török J, Kéki S, Bereczki D (2005) Asymmetric dimethylarginine: A molecule responsible for the coexistence of insulin resistance and atherosclerosis via dual nitric oxide synthase inhibition. *Med Hypotheses* 65 (6): 1091-1098 (IF: 0.607)

Zsuga J, **Gesztelyi R**, Bereczki D (közlés alatt) Aszimmetrikus dimetilarginin: egy új rizikófaktor az ateroszklerózis és inzulinrezisztencia kialakulásában. *Metabolizmus*

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki elsőként témavezetőmnek, dr. Szentmiklósi József egyetemi docensnek, akitől a kísérletes és elméleti kutatómunka alapjait megtanultam, ami a jelen disszertáció megszületéséhez vezetett.

Köszönettel tartozom dr. Tósaki Árpád egyetemi tanárnak és dr. Vecsernyés Miklós egyetemi docensnek, akiknek segítségével nélkül nem tudtam volna ezt a munkámat befejezni.

Köszönöm dr. Kovács Péter egyetemi tanárnak, a Gyógyszertani Intézet volt igazgatójának, hogy kérdéseimmel mindig fordulhattam hozzá, valamint a jelenlegi igazgatónak, dr. Szilvássy Zoltán egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette kísérletes munkámat az intézetben.

Köszönöm dr. Cseppentő Ágnes egyetemi tanársegédnek a kísérleteim során nyújtott útmutatásokat.

Köszönöm Hauszmann Éva, Juhászné Ildikó és Dobák Krisztina laboratóriumi asszisztenseknek, továbbá időszakos munkatársaimnak, Karsai Dénesnek, dr. Juhász Bélának és Jakab Anitának segítségüket és a kísérletezés közbeni vidám pillanatokat.

Köszönöm végül feleségemnek, dr. Zsuga Juditnak az első közös kísérleteket, szakmai beszélgetéseinket, valamint a kéziratok nyelvtani és stílári javítását.

A kísérletes munka anyagi fedezetét témavezetőm ETT 04/473/2000 és ETT 202/2003 témátámogatásai szolgáltatták.