

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Szabó Adrienn Mónika

**A receptoriális válaszkészség módszer (RRM)
sajátosságai és *in silico* alkalmazása**

DEBRECENI EGYETEM
TÁPLÁLKOZÁS- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2021.

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A receptoriális válaszkészség módszer (RRM)
sajátosságai és *in silico* alkalmazása**

Dr. Szabó Adrienn Mónika

TÉMAVEZETŐ: Dr. Gesztelyi Rudolf



DEBRECENI EGYETEM
TÁPLÁLKOZÁS- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2021.

Az ember erősebb, mint a sors, s mindent ki lehet bírni, ha jó a lelkiismeretünk.

Márai Sándor

Tartalomjegyzék

1. Fontosabb rövidítések	1
2. Bevezetés és célkitűzések.....	2
2.1. Az általunk <i>in silico</i> és <i>ex vivo</i> vizsgált biológiai rendszer fő sajátosságai.....	2
2.1.1. Adenozin, adenozin analógok és receptoraik	2
2.1.2. Az adenozinerg rendszer táplálkozástudományi jelentősége	4
2.1.3. Az adenozin viselkedése a pitvari myocardiumban	7
2.2. Az alkalmazott kvantitatív receptorműködési modellek	11
2.2.1. A Hill egyenlet	11
2.2.2. A farmakológiai agonizmus operatív modellje	13
2.2.3. A receptorális válaszkészség módszer (RRM).....	15
2.3. Az <i>in silico</i> vizsgálat előzményei és célja	18
2.4. Az <i>ex vivo</i> vizsgálat előzményei és célja.....	21
3. Anyagok és módszerek.....	26
3.1. <i>In silico</i> módszerek.....	26
3.1.1. Az izolált, ingerelt tengerimalac bal pitvari myocardium adenozin homeosztázisának és a kontraktilitását érintő A ₁ adenozinerg szabályozás számítógépes szimulációja	26
3.1.2. Az egyszerű (egyetlen agonista hatását konvencionális módon kifejező) koncentráció-hatás görbék felvétele	29
3.1.3. Az összetett (két agonista közös hatását az egyik figyelmen kívül hagyása mellett kifejező) koncentráció-hatás görbék felvétele.....	29
3.1.4. A szimulált koncentráció-hatás görbék jellemzése	30
3.1.5. Az <i>ex vivo</i> rendszer <i>in silico</i> modelljének fejlesztése	31
3.2. Anyagok és <i>ex vivo</i> módszerek.....	32
3.2.1. Vegyszerek és oldatok	32
3.2.2. Állatok és preparátumok.....	33
3.2.3. Kísérleti protokollok és csoportok.....	33
3.2.4. Az <i>ex vivo</i> koncentráció-hatás görbék kiértékelése.....	34
3.2.5. Az <i>ex vivo</i> koncentráció-hatás görbék jellemzése	36
3.2.6. A torzító koncentráció meghatározása	36
3.2.7. Görbeillesztési beállítások.....	37
3.3. Adatfeldolgozás	37

4. Eredmények	39
4.1. <i>In silico</i> eredmények.....	39
4.1.1. Az 1. és 2. modell	39
4.1.2. A 3. modell	41
4.1.3. A 4. modell	42
4.1.4. A 4. modell 1. és 2. variánsa	43
4.2. <i>Ex vivo</i> eredmények.....	44
4.2.1. Az adenzinra adott válasz	44
4.2.2. A szintetikus A ₁ adenzin receptor agonistákra adott válasz	44
4.2.3. Illesztés a szintetikus A ₁ adenzin receptor agonisták torzult koncentráció-hatás görbéire.....	45
4.2.4. Illesztés a szintetikus A ₁ adenzin receptor agonisták intakt koncentráció-hatás görbéire.....	49
5. Megbeszélés	50
5.1. <i>In silico</i> következtetések.....	50
5.2. <i>Ex vivo</i> következtetések.....	55
5.3. Vizsgálataink általános következtetései	59
6. Az új eredmények összefoglalása	61
7. Summary of the findings.....	62
8. Irodalom	63
8.1. A disszertáció elkészítéséhez felhasznált irodalom.....	63
8.2. A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények és egyéb publikációk	73
9. Tárgyszavak	75
10. Köszönetnyilvánítás.....	76

1. Fontosabb rövidítések

A₁ receptor: A₁ adenosin receptor

Ado: adenosin

CHA: N⁶-cyclohexyladenosine

CPA: N⁶-cyclopentyladenosine

c_x: az RRM által szolgáltatott eredmény (torzító agonista koncentráció)

E/c: koncentráció-hatás (más megfogalmazásban: koncentráció-válasz)

EC₅₀: félhatásos (az E_{max} felét kiváltó) agonista koncentráció

E_{max}: maximális hatás (egy adott szövet adott receptorát ingerelve egy adott agonistával)

FSCPX: 8-cyclopentyl-N³-[3-(4-(fluorosulfonyl)benzoyloxy)propyl]-N¹-propylxanthine

NBMPR: nitrobenziltioinozin (nitrobenzylthioinosine); az értekezést megalapozó vizsgálatok során S-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine-t használtunk

NBTI: ld. NBMPR

NECA: 5'-(N-ethylcarboxamido)adenosine

RRM: receptoriális válaszkészség módszer (receptorial responsiveness method)

SD: standard deviáció

SEM: az átlag standard hibája (standard error of the mean)

2. Bevezetés és célkitűzések

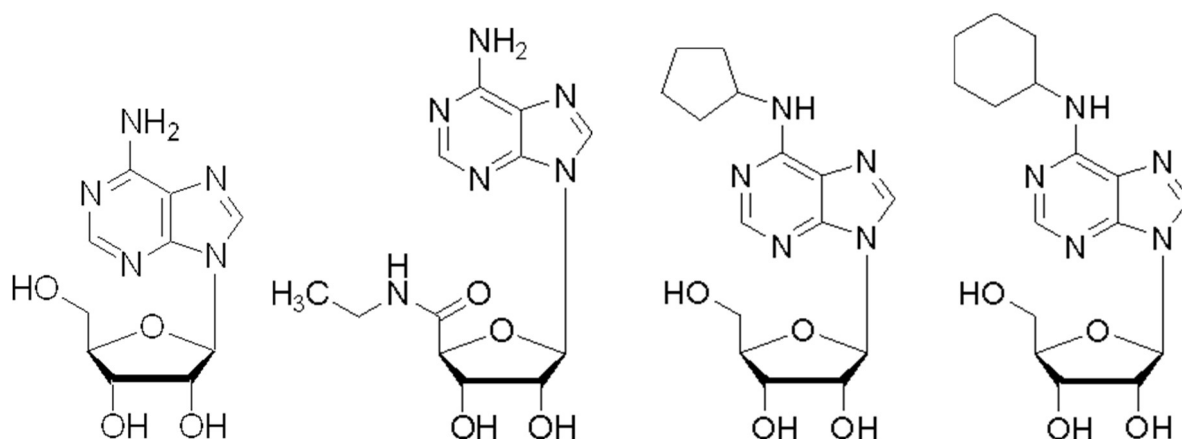
2.1. Az általunk *in silico* és *ex vivo* vizsgált biológiai rendszer fő sajátosságai

2.1.1. Adenozin, adenozin analógok és receptoraik

Az adenozin adeninből és ribózból álló nukleozid, a nukleinsav anyagcsere metabolitja a guanozin, uridin, timidin és citidin mellett. Az adenozin kitüntetett szerepe abból fakad, hogy egyben az adenozin receptorcsalád endogén agonistája is. A filogenetikailag ősi purinerg receptorok közé tartozó adenozin receptorok hét transzmembrán doménnel rendelkeznek, G protein-kapcsoltak, ortosztérikus kötőhelyük az interstitium felé néz. Az adenozin receptoroknak három típusát különböztetjük meg: A₁, A₂ és A₃ adenozin receptor; az A₂-n belül pedig két altípus differenciálható: az A_{2A} és A_{2B}. Az A₁ adenozin receptor (A₁ receptor) stimulációja protektív és regeneratív folyamatokat indít el testszerte (Fredholm és mtsai, 2001, 2011a, 2019; Burnstock, 2018; Borea és mtsai, 2018; Ciruela, 2020; Effendi és mtsai, 2020).

Az adenozin nagy aktivitású enzimek szubsztrátja, ezért *ex vivo* és *in vivo* felezési ideje kicsi (0.6 – 10 s) (Wilbur és Marchlinski, 1997; Pavan és IJerman, 1998; Borea és mtsai, 2018). A szintetikus A₁ receptor agonisták többsége az adenozinnál nagyobb féléletidejű vegyület, mivel rosszabb szubsztrátjai az adenozin metabolizmusában szereplő enzimeknek (Pavan és IJerman, 1998; Fredholm és mtsai, 2001, 2011a). Ezzel összhangban a nagy felezési idejű, szintetikus A₁ receptor agonisták E/c görbéi balra toltak az azonos körülmények között felvett adenozin E/c görbééhez képest (Gesztelyi és mtsai, 2003; Gesztelyi és mtsai, 2013). A stabil agonisták E/c görbéi emellett szabályosabbak és megbízhatóbban jellemzik az A₁ receptor működését, ezért vizsgálatainkban három szintetikus A₁ receptor agonistát is alkalmaztunk: NECA (5'-(N-ethylcarboxamido)adenosine), CPA (N⁶-cyclopentyladenosine) és CHA (N⁶-cyclohexyladenosine) (1. ábra). Szemben az adenozin valamennyi adenozin receptor iránti affinitásával és agonista viselkedésével, a NECA csak az A₁ és A₂ receptorokat ingerli, míg a CPA és CHA szelektív A₁ receptor agonista. Noha a CHA által kiváltott maximális hatás (a negatív inotrópia tekintetében) a korábbi (Gesztelyi és mtsai, 2013) és a jelen vizsgálatok során valamivel kisebbnek mutatkozott, mint a többiek esetében, mind a négy fentebb

említett ligandot az A₁ receptor teljes („full”) agonistájaként tartják számon (Fredholm és mtsai, 2001; Deb és mtsai, 2019).



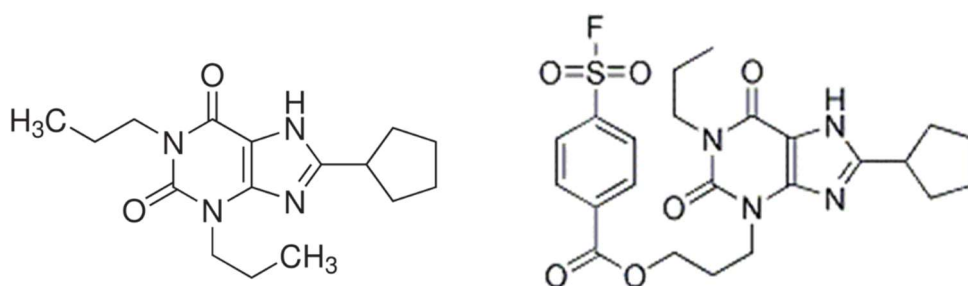
1. ábra. Az adenosin, NECA, CPA és CHA szerkezete (balról jobbra)

Az adenosin és három, a fentiekben említett analógja valamennyien ribóz-vázra épülnek, ami a NECA esetében – egyedülként – módosított (Elzein és Zablocki, 2008). A CPA az adenosinnál lényegesen lassabban eliminálódik biológiai rendszerekből (Pavan és IJzerman, 1998), az általunk használt vértelen pitvarszövetben pedig különösen stabil (Gesztelyi és mtsai, 2004). A CHA eliminálódik a leglassabban *in vivo* és *ex vivo*, nemcsak az itt említett molekulák közül, hanem általában az A₁ receptor agonisták körében (Pavan és IJzerman, 1998).

A legkorábbi receptor modellek az agonistát kötött receptor aktiválódása esetében egyetlen aktív állapotot tételeztek fel (Ruffolo, 1982). Noha később, a parciális agonisták hatásának magyarázatára már felvetették több, különböző mértékben aktív receptor konformáció létezését, az agonisták funkcionális szelektivitásának gondolata nem tekint vissza hosszú múltra. Eszerint ugyanazon receptor különböző agonistái nemcsak a kiváltható maximális hatás nagyságában térhetnek el egymástól, hanem előfordulhat, hogy eltérő szignalizációs útvonalakat aktiválva (vagy legalábbis a különböző jelátviteli utakat eltérő mértékben stimulálva) eltérő hatásprofilot produkáljanak. Amennyiben egy adott receptor esetében tipikusnak tartanak egy bizonyos hatásprofil, az ettől való eltérést torzult agonizmusnak (biased agonism) is nevezik (Vecchio és mtsai, 2018). A mi kísérleteinkhez használt három szintetikus agonista (NECA, CPA, CHA) esetében is megfigyelték, hogy az általuk aktivált A₁ receptor eltérő preferenciával kapcsolódik különböző típusú G proteinekhez (Verzijl és Ijzerman, 2011), bár az A₁ receptor esetében a különböző agonisták

funkcionális szelektivitása általában nem eredményez különösebben diverz hatásokat (Langemeijer és mtsai, 2013). A funkcionális szelektivitás (torzult agonizmus) létezése minden esetre aláhúzza a többféle agonista használatának előnyös voltát ugyanabban a biológiai rendszerben valamely hatás vagy jelenség vizsgálatakor.

A CPX avagy DPCPX (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine) és az FSCPX (8-cyclopentyl-3-[3-[[4-(fluorosulfonyl)benzoyl]oxy]propyl]-1-propylxanthine) mindketten olyan adenzin analógok, amelyek szelektív A₁ receptor antagonisták (2. ábra). A CPX kötődése az A₁ receptorhoz reverzibilis és így azt kompetitív módon gátolja (Fredholm és mtsai, 2001). Az FSCPX először szintén reverzibilisen kötődik az A₁ receptorhoz, ezt azonban egy időigényes, feltehetően kovalens kapcsolódási lépés követi, amely az FSCPX-et irreverzibilis antagonistává teszi (van Muijlwijk-Koezen és mtsai, 2001; Srinivas és mtsai, 1996; Morey és mtsai, 1998). Az FSCPX kedvezőtlen tulajdonsága, hogy vizes közegben gyorsan (pár perc alatt) elbomlik (van Muijlwijk-Koezen és mtsai, 2001). Érdekes módon ennek ellenére *ex vivo* és *in vivo* ki tudja fejteni irreverzibilis gátló hatását. Ez felveti, hogy élő biológiai rendszerekben azok lipid fázisába oldódva az FSCPX védetté válik és el tudja érni membránhoz kötött célpontját, az A₁ receptort.



2. ábra. A CPX (balra) és FSCPX (jobbra) szerkezete

2.1.2. Az adenzinerg rendszer táplálkozástudományi jelentősége

Habár az adenzinerg rendszer gastrointestinalis traktusban való szerepét sokáig nem fogadta el a tudományos közvélemény, már egészen korán, az 1970-es években megszületett a felvetés, hogy az adenzin-származék ATP extracelluláris szignálmolekulaként is képes viselkedni (Burnstock, 1972, 1976). A gastrointestinalis non-adrenerg, non-kolinerg rendszer mára már tankönyvi jelentőségű tény, így nem nehéz összefüggést találni az adenzinerg rendszer és a táplálkozástudomány között sem.

A húsok (melyek parenchymája a harántcsíkolt izom) sok ATP-t tartalmaznak. A megromlás ellen kezelt, állni hagyott húsok ATP tartalma idővel adenzin-monofoszfáttá, az pedig részben inozin-monofoszfáttá (inozinsav) alakul, melynek íze az umami (japán: 旨味 = umami = íz, zamat) egyik komponense (Hong és mtsai, 2017). Az umami ízminőség forrása döntően a fehérjékből felszabaduló glutamát nátrium-sója, de emellett a természetes eredetű táplálékokban több nukleotid is részt vesz a kialakításában, így az inozin-monofoszfát is, melyet E630 szám alatt ízfokozóként is használnak (Food-Info, 2020).

Maga az adenzin-monofoszfát „saját” protein kinázt aktivál (AMP-aktivált protein kináz: AMPK), ami az ún. gyógyhatású élelmiszerek (az angol szakirodalomban a táplálék és gyógyszer szavak összevonásából: nutraceuticals) egyik célpontja (Marín-Aguilar és mtsai, 2017). Az AMPK energia-érzékelőként működik a sejteken belül, aktiválódása az ATP-megőrzés felé billenti el a metabolizmust. Az AMPK aktivitásának csökkenését számos tanulmány különféle betegségekkel hozza összefüggésbe (pl. diabetes mellitus, kardiovaszkuláris és neurodegeneratív betegségek) (Friedrichsen és mtsai, 2013; Ullah és mtsai, 2014). A táplálékkal bevitt növényi hatóanyagok közül (pl. antocianinok, flavonolok, lignánok) több is képes aktiválni az AMPK-t és ezzel befolyásolni az adenzinerg rendszer működését (Marín-Aguilar és mtsai, 2017).

Vannak az adenzin receptorokra közvetlenül ható gyógyhatású élelmiszerek (funkcionális táplálékok) is. Az adenzin önmagában is gyulladás-csökkentő, immunszuppresszáns hatású biomolekula, ami gyulladásos környezetben fokozott mértékben keletkezik sejt felszíni ektonukleotidázok által, akár bakteriális sejtek felszínén is (Alam és mtsai, 2015). Az így képződött extracelluláris adenzin jótékony hatású lehet, amennyiben visszafogja a túlzott immunválaszt, de káros is lehet, ha a baktériumok túlélését segíti elő a gyulladás korlátozásával (Alam és mtsai, 2015).

Természetesen meg kell említeni a kávéfogyasztás adenzinerg rendszert befolyásoló hatását is, mint jelentős táplálkozástudományi kapcsolatot: a (több más növény mellett a) kávéban előforduló metilxantin-származék koffein nem-specifikus (A_1 és A_2) adenzin receptor antagonistá hatású (Chen és mtsai, 2013). A metilxantin-származék koffein stimuláns hatású, ami ellensúlyozza a központi idegrendszerben (elsősorban a homloklebeny basális régiójában) az ébrenlét során fokozatosan felhalmozódó adenzin altató hatását (Lazarus és mtsai, 2019).

Az adenozinerg rendszeren ható gyógyszerek kifejlesztésének éppen az a nehézsége, hogy az adenozinerg szabályozás általánosan jelen van a szervezetben és ezért hatásai rendkívül szerteágazóak (Chen és mtsai, 2013; Fredholm és mtsai, 2011a; Nicolaidis, 2006; Freilich és Tepper, 1992). A tradicionális (különösen a kínai) gyógyászat azonban számos olyan gyógynövényt tart számon, melyek kedvező hatásai, legalábbis részben, az adenozinerg rendszer befolyásolásán keresztül érvényesülnek. A teljesség igénye nélkül: *Polygala tenuifolia*, *Valeriana officinalis*, *Gastrodia elata*, *Paeoniae radix*, *Smilax glabra* és *Dioscorea polystachya*.

A kínai pacsirtafű vagy más néven kínai szenegafű (*Polygala tenuifolia*) gyökere a kínai medicinában szedatív és köptető hatású gyógyszerek készítésre használatos, de gyulladáscsökkentő, memória-serkentő és neuroprotektív hatásáról is beszámoltak (Park és mtsai, 2006). Szedatív hatása hátterében A_{2A} adenzin receptor agonizmust feltételeznek (Kwon és mtsai, 2004). A macskagyökér (*Valeriana officinalis*) vizes kivonatának szedatív és antikonvulzív hatása feltehetőleg A_1 receptor stimuláláson keresztül valósul meg (Rezvani és mtsai, 2010). Az orchideafélékhez tartozó *Gastrodia elata* egy, szintén a tradicionális kínai medicina által felismert gyógynövény: gyöktörzs-kivonatának neuroprotektív hatása van, melyben az A_{2A} receptor stimulálása játssza a fő szerepet (Tsai és mtsai, 2011). A monoterpén-glikozid paeoniflorin a *Paeoniae radix* (bazzarózsa gyökér) egyik legfontosabb hatóanyaga, ami az A_1 receptor aktiválásán keresztül váltja ki neuroprotektív és allodynia csökkentő hatását (Andoh és mtsai, 2017). A *Smilax glabra* (sarsaparilla vagy szárcsagyökér) gyöktörzsének fő hatóanyaga a flavonoid astilbin, melynek gyulladáscsökkentő, immunmoduláns hatása az A_{2A} receptor expressziójának fokozására vezethető vissza. Az astilbin kis dózisú metotrexáttal kombinálva hatékonyan mutatkozott a reumatoid arthritis kezelésében, melynek köszönhetően csökkenthető volt a metotrexat dózisa és így toxicitása (Ma és mtsai, 2018). A jamgyökér vagy más néven jász (*Dioscorea polystachya*) orális adás mellett védő hatást fejtett ki a lipopoliszachariddal kiváltott sepsis indukálta szívizom kontraktilitás-csökkenéssel szemben, melyet adenzin tartalmára vezettek vissza (kiindulva abból, hogy az orálisan adott adenzinnak hasonló hatása volt) (Zeng és mtsai, 2019).

2.1.3. Az adenosin viselkedése a pitvari myocardiumban

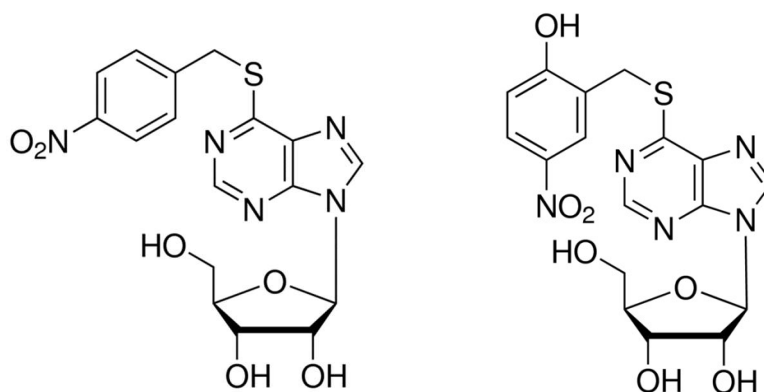
Az A_1 receptor szinte minden szövetben megtalálható (Fredholm és mtsai, 2001, 2011a, 2019; Burnstock és mtsai, 2010; Burnstock, 2018; Borea és mtsai, 2018), köztük a myocardiumban is, melynek fő adenosin receptor típusa (Burnstock és Pelleg, 2015). Az A_1 receptor funkciója döntően protektív és regeneratív folyamatok iniciálását foglalja magába (Fredholm és mtsai, 2001, 2011a; Headrick és mtsai, 2003, 2013; Szentmiklósi és mtsai, 2011, 2015; Ciruela, 2020; Effendi és mtsai, 2020). Ilyen protektív működésnek tekinthetők az A_1 receptor által mediált negatív tróp hatások, köztük az erőteljes negatív inotróp hatás is. Kétféle negatív inotróp hatást különböztethetünk meg: az indirektet, ami a stimulált kontrakciós erőt redukálja a nyugalmi szintre, és a direktet, ami a nyugalmi kontrakciós erőt is képes csökkenteni. Előbbi a pitvarokon és a kamrákon is megfigyelhető, míg utóbbi csak a pitvarokra jellemző (Kurachi és mtsai, 1986; Belardinelli és mtsai, 1995; Shryock és Belardinelli, 1997).

Az A_1 receptor negatív inotróp működése két fő jelátviteli úton keresztül valósul meg: muszkarin aktiválta K^+ csatorna nyitását és az adenilcikláz enzim gátlását. A muszkarin aktiválta K^+ csatorna főleg supraventricularis lokalizációjú, adenilcikláz a kamrákban is jelentős mennyiségben megtalálható (Belardinelli és mtsai, 1995). Az A_1 receptor aktiváció mind pitvaron, mind kamrán a nyugalmi szintre viszi vissza az adenilcikláz aktivitását, ami a stimulált kontrakciós erőt a nyugalmi értékre csökkenti (indirekt negatív inotróp hatás). Pitvaron ugyanakkor az A_1 receptor stimuláció a legtöbb emlős fajon a nyugalmi érték alá is le tudja vinni a kontraktilitást (direkt negatív inotróp hatás), amit a muszkarin aktiválta K^+ csatorna fokozott pitvari expressziójának számlájára írnak (Kurachi és mtsai, 1986; Belardinelli és mtsai, 1995). A jelen disszertációt megalapozó kísérletek során adenilcikláz stimulációt nem alkalmaztunk, tehát végig az A_1 receptor direkt negatív inotróp működésével találkoztunk.

Fiziológiás viszonyok között (kiemelt jelentőségű ebben a normoxia) a szívizom adenosin metabolizmusát nettó interstitialis keletkezés és intracelluláris elimináció jellemzi. Ennek következtében a cardiomyocyta nukleozid transzporterein az adenosin folyamatosan a sejtek belseje felé áramlik, ami fontos eleme a különböző szöveti kompartmentek adenosin szintjeit fenntartó dinamikus egyensúly biztosításának (Deussen és mtsai, 1999; Deussen, 2000a, 2000b). A transzmembrán adenosin áramlás a myocardiumban elsősorban nagy kapacitású, ENT1 típusú transzportereken keresztül folyik. Az ENT1 transzporterek ekvilibratívak és nitrobenziltioinozinnal (NBMPR vagy NBTI) gátolhatóak (Conant és

Jarvis, 1991; Thorn és Jarvis, 1996; Dekanski és mtsai, 2004; Pastor-Anglada és Pérez-Torras, 2018). Ez hozzájárul az adenosin *in vivo* (és *ex vivo*) tapasztalható rövid féléletidejéhez, valamint ahhoz, hogy az interstitialis adenosin-szintet és annak változásait – a dinamikus egyensúly érzékenysége miatt – nehéz pontosan megmérni (Bassingthwaighe, 1992; Karsai és mtsai, 2006; Ramakers és mtsai, 2008). Ezzel szemben az adenosin egyes szintetikus analógjai (CPA, CHA, NECA), amelyek rosszabb szubsztrátjai az adenosint átalakító enzimeknek (Pavan és IJzerman, 1998), hosszabb felezési idejűek és ezért koncentrációjuk könnyebben meghatározható (sőt, *ex vivo* körülmények között a beadott dózisból és a térfogatból egyszerűen ki is számolható) (Gesztelyi és mtsai, 2004).

Az NBTI (3. ábra) általi ENT1 blokádnak az általunk használt *ex vivo* tengerimalac bal pitvar modellen is növeli az endogén adenosin interstitialis koncentrációját (Karsai és mtsai, 2006, 2007; Kiss és mtsai, 2013; Pak és mtsai, 2014), melyet a cardiomyocytákba irányuló adenosin transzport gátlása és ezáltal az (extracellulárisnál jóval intenzívebb) intracelluláris adenosin elimináció kivédése magyaráz (Deussen és mtsai, 1999; Deussen, 2000a, 2000b). Az NBTI endogén adenosinra kifejtett hatásának vizsgálatára munkacsoportunk a korábbiakban saját eljárást fejlesztett ki, a receptorális válaszkészség módszert (receptorial responsiveness method: RRM). Ennek lényege, hogy NBTI jelenlétében olyan A₁ receptor agonistával veszünk fel E/c görbét, aminek az interstitialis koncentrációját nem befolyásolja az NBTI (Karsai és mtsai, 2006, 2007; Kiss és mtsai, 2013; Pak és mtsai, 2014; Erdei és mtsai, 2018).



3. ábra. Két nitrobenziltioinoszin vegyület, az S-(4-nitrobenzyl)-6-thioinosine (balra) és az S-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine (jobbra) szerkezete. Vizsgálataink során ez utóbbit használtuk.

A szintetikus CPA jóval ellenállóbb az adenzint átalakító enzimekkel szemben, mint maga az adenzin (Pavan és IJerman, 1998), ezért szöveti koncentrációit jóval kevésbé befolyásolja az NBTI. Az NBTI (megfelelő koncentrációban) jelentősen befolyásolja a CPA E/c görbét (munkacsoportunk a bal pitvari negatív inotróp hatást vizsgálta): csökkenti a maximális hatást (E_{max}) és növeli a félhatásos adenzin koncentrációt (EC_{50}) (Karsai és mtsai, 2006, 2007; Kiss és mtsai, 2013; Pak és mtsai, 2014; Erdei és mtsai, 2018). Ez a jelenség az NBTI hatásmechanizmusára vezethető vissza (az ENT1-en keresztüli adenzin transzport gátlása), de összefügg a E/c görbék hagyományos készítése és kiértékelési módjával is. Mivel az NBTI a E/c görbe felvétele előtt kerül a rendszerbe, már akkor csökkenti az endogén adenzin sejtekbe irányuló transzportját, melynek következtében az adenzin felszaporodik az interstitiumban és elhasználja az A_1 receptorok válaszadási kapacitásának egy részét a E/c görbe felvétele előtt. Ha a többlet endogén adenzint és annak hatását nem vesszük figyelembe a E/c görbe kiértékelésekor, a ténylegesnél kisebb A_1 receptor válaszkészséget kapunk (ami a tapasztalt kisebb E_{max} -ban és nagyobb EC_{50} -ben nyilvánul meg).

A biológiai rendszerekben kis felezési idejű (bomlékony) adenzin bal pitvari E/c görbét ugyanakkor az NBTI összetett módon befolyásolja. Itt az NBTI eredő hatása két, egymással ellentétes komponensre bontható. Az egyik komponens a CPA esetében is tapasztalható E_{max} csökkenés és EC_{50} növelés, melynek hátterében az endogén adenzin (már a görbefelvétel előtt kialakuló) interstitialis akkumulációja áll. Ezzel szemben a másik komponens növeli az E_{max} -ot és csökkenti az EC_{50} -et, melynek oka a E/c görbe felvételéhez használt (exogén) adenzin transzportjának és ezáltal eliminációjának csökkenése, ami növeli az interstitialis exogén adenzin-szintet a E/c görbe felvétele során (ez utóbbi fontos körülmény). E két komponens eredőjeként az NBTI kismértékben csökkenti az adenzin E/c görbe E_{max} -át, ugyanakkor markánsan csökkenti az EC_{50} -ét (Karsai és mtsai, 2006, 2007; Kiss és mtsai, 2013; Pak és mtsai, 2014; Zsuga és mtsai, 2017; Erdei és mtsai, 2018).

Összefoglalva az eddigieket: függetlenül a E/c görbéhez használt A_1 receptor agonista mibenlététől, az NBTI által interstitialisan felhalmozott többlet endogén adenzin jellegzetes torzulást hoz létre egy *in vivo* vagy *ex vivo* rendszerben készített E/c görbén (E_{max} csökkenés és jobbra tolódás a kontrollhoz képest). Ez a torzulás azonban akkor szembetűnő, ha ez az NBTI egyedüli hatása a E/c görbére (tehát az NBTI hatása egykomponensű). Ez akkor fordulhat elő, ha a E/c görbe felvételéhez használt agonista interstitialis koncentrációját nem (vagy alig) befolyásolja az NBTI (ld. CPA). Ekkor a E/c görbe torzulásának mértékéből lehetőség nyílik az endogén adenzin-többlet kvantifikálására az RRM segítségével, ami

megadja egy stabil agonista (amivel a E/c görbe felvételre került) ekvielektív koncentrációját (Gesztelyi és mtsai, 2004; Karsai és mtsai, 2006, 2007).

Munkacsoportunk (*ex vivo* és *in silico* adatokkal való korábbi munkája során) háromféle E/c görbét különböztetett meg: torzítatlan, torzult és korrigált görbéket (Kiss és mtsai, 2013; Pak és mtsai, 2014; Zsuga és mtsai, 2017). Egy E/c görbét akkor tekinthetünk torzítatlannak, ha minden hatás és a hatások létrehozásában résztvevő minden agonista minden koncentrációja figyelembe lett véve megszerkesztésekor. Ebből következik, hogy egy torzult E/c görbe esetében van (legalább egy) olyan agonista koncentráció, ami részt vett a hatások kiváltásában, de nincs figyelembe véve (se az adott koncentráció, se a hatása). Ha egy torzult E/c görbéhez meghatározzuk a torzító koncentrációt, a torzulás korrigálható. Bizonyos körülmények között az RRM alkalmas arra, hogy meghatározzuk egy, az adott biológiai rendszerben stabil agonista azon koncentrációját (c_x), ami ekvielektív egy torzító koncentrációval (c_{bias}). Mivel a c_{bias} agonistája nem kell, hogy feltétlenül azonos legyen a c_x agonistájával, az RRM használható egy bomlékony agonista (más módon nehezen meghatározható) torzító koncentrációjának kvantifikálására.

Teljes korrekciónak azt tekinthetjük, ha a torzult E/c görbéhez olyan torzítatlan E/c görbét szerkesztünk, ahol az X és az Y tengely is korrekt. Erre akkor van lehetőség, ha az X tengelyen feltüntetett koncentrációkhoz tartozó agonista stabil. Ekkor ugyanis a receptorközel (vagyis a hatást ténylegesen kiváltó) koncentrációk jó közelítéssel megegyeznek a beadott dózissal és a rendszer térfogatából számolható koncentrációkkal, vagy azokkal, amelyek az élőlény monitorozott kompartmentjében (pl. a vérplazmában) mérhetőek. Ha az X tengely agonistája gyorsan eliminálódik a rendszerben, nincs lehetőség korrekt X tengely megszerkesztésére. Ha azonban a torzító koncentrációt (még ha a hozzá tartozó agonista bomlékony is) sikerül egy stabil agonista ekvielektív koncentrációjával meghatározni, az Y (hatás) értékek korrigálhatóak (még ha az X tengelyen a bomlékony agonista megbízhatatlan koncentrációi vannak is feltüntetve). Ez lehetőséget ad olyan részlegesen korrigált E/c görbék megszerkesztésére, melyeknél a korrigált hatás értékek a E/c görbe során beadott bomlékony agonista koncentrációihoz vannak rendelve. Ezek a görbék, hibrid voltak ellenére, rendelkeznek gyakorlati jelentőséggel, például alkalmasak a bomlékony agonistára vonatkozó receptor rezerv vizsgálatára (Kiss és mtsai, 2013; Pak és mtsai, 2014; Zsuga és mtsai, 2017; Erdei és mtsai, 2018).

2.2. Az alkalmazott kvantitatív receptorműködési modellek

2.2.1. A Hill egyenlet

A Hill egyenlet a receptorok működésének első tisztán kvantitatív modellje (Hill, 1910). Ma is kiterjedten használják ligandkötési esszék eredményeinek feldolgozásához és E/c görbék jellemzésére, továbbá szerepel a bonyolultabb receptorelméletekben is. A ligandkötési illetve E/c görbéket általában három paraméterrel jellemzi, de tartalmazhat négy paramétert is (Giraldo és mtsai, 2002; Motulsky és Christopoulos, 2004; Gesztelyi és mtsai, 2012; Finlay és mtsai, 2020).

Receptor alatt olyan makromolekuláris nagyságrendű sejtalkotó struktúrát értünk, ami egyrészt bizonyos ligandok specifikus megkötése révén jelfelismerésre képes (kognitív funkció), másrészt egyes ligandok (ún. agonisták) megkötése után megváltoztatja a hordozó sejt működését (transzducer funkció). Ebben a folyamatban részt vehetnek olyan sejtalkotó makromolekulák is (enzim, csatorna, transzporter), melyek nem tartoznak a receptorhoz (posztreceptorális jelátvitel). A jelátvitel során legtöbbször jelerősítés történik (mennél bonyolultabb a jelátvitel, általában annál nagyobb).

Egy nemzetközi ajánlás a ligand koncentráció és a receptor-ligand komplex koncentrációja közötti kapcsolatot leír egyenletet Hill-Langmuir egyenletnek nevezi, míg az agonista koncentráció és a kiváltott hatás kapcsolatát leíró egyenletet Hill egyenletnek (Neubig és mtsai, 2003).

A Hill modell a ligand (L) vagy ligandok kötődését a receptorhoz (R) egy lépésben tételezi fel:



A Hill-Langmuir egyenlet a folyamatban résztvevő anyagok koncentráció-arányainak az egyensúlyi állapotra való felírása, a tömeghatás törvényével összhangban, pár egyszerűsítést bevezetve:

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

ahol: L: a ligand; R: a receptor; L_nR : a ligand-receptor komplex; $[L_nR]$: a ligand-receptor komplex koncentrációja; $[R_0]$: a összes (szabad és kötött) receptor koncentrációja; $[L]$: eredetileg a szabad ligand koncentrációja, amit egyszerűsítésképpen az összes (szabad és kötött) ligand koncentrációjaként értelmeztek át; k_1 illetve k_2 : a ligand-receptor komplex asszociációs illetve disszociációs reakciójának sebességi állandói; K_d : a ligand-receptor komplex egyensúlyi disszociációs állandója ($K_d = k_2/k_1$); K : a féltelítési ligand koncentráció; n : az 1. egyenletben egy receptor ligand-kötő helyeik száma, a 2. egyenletben már konkrét jelentés nélkül a Hill koefficiens (Hill-féle slope faktor) (Kenakin, 2018; Gesztelyi és mtsai, 2012; Finlay és mtsai, 2020).

A 2. egyenletbeli K állandó a ligand receptorhoz való affinitásának jellemzője (ha a K értéke nagy, az affinitás kicsi, ha pedig kicsi, nagy az affinitás). Ha a ligand agonista (kötődése után a receptor a hordozó sejt működését megváltoztatja), a K -t K_A -nak is jelölik (ld.: 9. egyenlet). Ha a ligand antagonist (kötődése után nincs változás, de a receptorhoz az antagonist távozásáig nem tud szintópikus agonista kötődni), a K -t K_B -nak is írják.

A Hill egyenletet széles körben használják E/c görbék regresszióanalízisére:

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

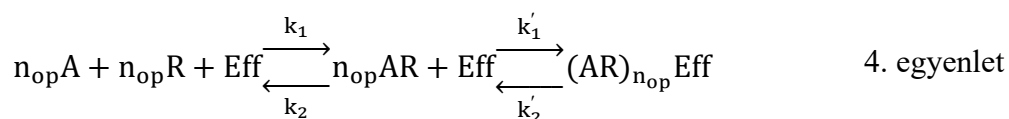
ahol: c : az agonista koncentrációja; E : a kiváltott hatás; $E_{\max}$: az adott rendszerben az adott agonistával elérhető maximális hatás; EC_{50} : a félhatásos agonista koncentráció; n : a Hill koefficiens (Kenakin, 2018; Gesztelyi és mtsai, 2012).

A Hill egyenlet által definiált függvény lineáris X tengely mellett ábrázolva hiperbola, ha $n=1$, míg logaritmikus X tengely mellett szimmetrikus szigmoid lefutású (vagyis a függvény középpontja, ahol az EC_{50} van, a két görbület inflexiós pont is egyben). Ez összhangban áll a tapasztalattal, hogy a E/c görbék többsége szemilogaritmikus ábrázolás esetén szigmoid lefutású, sőt általában szimmetrikus is (Gesztelyi és mtsai, 2012).

A Hill egyenlettel végzett görbeillesztés kétváltozós (c , E), háromparaméteres ($E_{\max}$, EC_{50} , n) és nemlineáris. A Hill egyenlet igen flexibilisen illeszkedik, ezért jelentős hibával terhelt Y adatok esetén is (mérési hiba, biológiai variabilitás) jó becslést ad (Giraldo és mtsai, 2002). A Hill modell kevés megkötést tartalmaz a receptor jelátviteli folyamataira (pl. feltételezi a E/c görbék szimmetriáját, ami általában teljesül). Ebből fakadó hátránya, hogy paraméterei ($E_{\max}$, EC_{50} , n) empirikusak, nem fiziko-kémiai jelentéssel rendelkező állandók (Weiss, 1997; Giraldo és mtsai, 2002; Gesztelyi és mtsai, 2012; Finlay és mtsai, 2020).

2.2.2. A farmakológiai agonizmus operatív modellje

Az operatív modell is kvantitatív receptorműködési modell, ami csak olyan általános feltételezéseket tartalmaz a receptorműködés mechanizmusára, amelyek a legtöbb receptorra teljesülnek. Az operatív modell a receptorfunkciót két részre bontja, ami egy kétlépéses reakcióegyenlettel fejezhető ki. Ebben külön lépés vonatkozik a receptor jelfelismerő képességére és transzducer funkciójára (Black és Leff, 1983; Giraldo és mtsai, 2002; Kenakin, 2018):



ahol (az eddig még nem szereplő rövidítések): A: az agonista; Eff: az effektor, vagyis a hatás létrehozásában résztvevő posztreceptorális elemek, amelyek az agonista-receptor komplexhez kötődnek; AR: az agonista-receptor komplex; $(AR)_{n_{op}}\text{Eff}$: az agonista-receptor-effektor komplex; k_1' illetve k_2' : az agonista-receptor-effektor komplex asszociációs illetve a disszociációs sebességi állandói; n_{op} : az agonista-receptor-effektor komplexben az egy effektorra jutó agonista-receptor komplexek száma.

A 4. egyenletben feltüntetett anyagok egyensúlyi koncentrációi – mutatis mutandis – kifejezhetőek a Hill (illetve Hill-Langmuir) egyenlettel (Black és Leff, 1983):

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

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

ahol (a még nem definiált jelölések): $[A]$: az agonista koncentrációja; $[AR]$: az agonista-receptor komplex koncentrációja; K_A : az agonista-receptor komplex egyensúlyi disszociációs állandója (féltelítési agonista koncentráció); $[(AR)_{n_{op}}\text{Eff}]$: az agonista-receptor-effektor komplex koncentrációja (ami egyenesen arányos a hatás nagyságával); E_m : az adott rendszerben elérhető maximális hatás (pontosabban a jelerősítő működés maximuma); K_E : a félmáximális E_m -et létrehozó agonista-receptor komplex koncentráció; n_{op} : az operatív slope faktor, ami a Hill koefficiens megfelelője az operatív modellben. Az operatív slope faktor inkább a folyamat egészét jellemzi és nem a szignáltranszdukció molekularitását, hasonlóan a Hill koefficiens és a kötődés molekularitásának viszonyához.

Az 5. egyenlettel kifejezett $[AR]$ beírható a 6. egyenletbe:

$$E = E_m \cdot \frac{([A] \cdot [R_0])^{n_{op}}}{([A] \cdot [R_0])^{n_{op}} + (K_E \cdot ([A] + K_A))^{n_{op}}} \quad 7. \text{ egyenlet}$$

Az operatív hatékonyság ($\tau = [R_0]/K_E$) bevezetésével csökkenthető a modell (7. egyenlet) regressziós paramétereinek száma. Az operatív hatékonyság felhasználható az agonista hatáslétrehozó képességének (efficacy) jellemzésére. Egyszerűsítve az agonista koncentráció jelölését ($[A] = c$) is, a 7. egyenlet a következő alakra hozható:

$$E = E_m \cdot \frac{(c \cdot \tau)^{n_{op}}}{(c \cdot \tau)^{n_{op}} + (c + K_A)^{n_{op}}} \quad 8. \text{ egyenlet}$$

Az operatív modell közvetlenül illeszthető a modell igényeinek megfelelő E/c görbékre (ld. lentebb), ezáltal meghatározható a K_A , E_m és τ értéke (Black és Leff, 1983; Gesztelyi és mtsai, 2013). Közülük a K_A fiziko-kémiai jelentéssel bíró konstans, míg az E_m és a τ empirikus állandók (Giraldo és mtsai, 2002).

Az operatív modell kétváltozós (c , E), négyparaméteres (E_m , K_A , τ , n_{op}) és nemlineáris. Alkalmazásának legjobb módja, ha globálisan illesztjük (az E_m , K_A és n_{op} paraméterek megosztásával), amihez egy natív és egy irreverzibilis antagonistának kitett (de ettől eltekintve ugyanolyan körülmények között felvett) E/c görbére van szükség. Az irreverzibilis antagonistát olyan koncentrációban és ideig kell alkalmazni, hogy számottevően csökkentse a kezelt E/c görbe E_{max} -át a natív E/c görbééhez képest. Alkalmazása után az el nem reagált irreverzibilis antagonistát mennyiséget el kell távolítani, hogy szabad formában ne legyen jelen a E/c görbe felvételekor. A natív és a kezelt E/c görbék különbözősége így módon a funkcióképes receptorok eltérő mennyiségének hatását tükrözi. Ezt az illesztett modellt a τ paraméter változtatásával veszi figyelembe, mivel a másik három paraméter meg van osztva, tehát azonos a natív és a kezelt E/c görbék esetében (Motulsky és Christopoulos, 2004; Prism 8 Curve Fitting Guide, 2019; Finlay és mtsai, 2020).

Az operatív modellel szemben több kritikát is megfogalmaztak. Egyrészt, reakcióegyenlete (4. egyenlet) nem kezeli külön lépésként az agonista-receptor komplex kialakulását és aktív konformációba való átmenetét (Colquhoun, 1998, 2006; Bindslev, 2008). Emiatt a modell (8. egyenlet) illesztésével kapott K_A értékek – sok esetben – nem becsülők pontosan az agonista-receptor komplex ekvilibrium disszociációs konstansát (ami a K_A eredeti értelmezése), mivel a kapott K_A értékeket az agonista efficacy tulajdonsága is

befolyásolja (mely utóbbi szorosan összefügg az agonista azon képességével, hogy a receptort aktív konformációba juttassa). A 8. egyenlet illesztése által szolgáltatott a K_A értékeket ezért óvatosan kell kezelni (Colquhoun, 1998, 2006). Másrészt, az operatív modell nem redukálható (matematikai műveletekkel) a máig vitathatatlanul elfogadott, egyszerűbb kvantitatív receptorműködési modellekké (pl. a Hill modellé), vagyis nem teljesen kompatibilis velük (Buchwald, 2017, 2019, 2020).

2.2.3. A receptoriális válaszkészség módszer (RRM)

A receptoriális válaszkészség módszerrel (receptorial responsiveness method: RRM) – bizonyos körülmények között – egy agonista receptorközelbeli koncentrációjának akut növekedését lehet meghatározni. Egyszerűbb esetben az RRM közvetlenül is megadja a kérdéses agonista többlet-koncentrációját, általánosságban viszont egy másik agonista előbbivel ekvиеffektív koncentrációját adja meg (Gesztelyi és mtsai, 2004).

Vegyük két agonistát (nevezzük teszt illetve torzító agonistának) és egy, a két agonista közös receptorát tartalmazó biológiai rendszert, ahol a receptor által mediált hatást mérjük. Adjuk az agonistamentes rendszerhez a torzító agonista egy c_{bias} koncentrációját, de a kialakuló E_{bias} hatást hagyjuk figyelmen kívül. Ezután adjuk a rendszerhez a teszt agonista egy c koncentrációját és mérjük a kialakuló E' hatást. Ha viszont az agonistamentes rendszerhez egyszerre adjuk hozzá c_{bias} -t és c -t, egy E hatást mérhetünk. Az RRM szerint E_{bias} , E' és E között a következő kapcsolat áll fenn (Gesztelyi és mtsai, 2004; Greczer és mtsai, 2010a):

$$E' = 100 - \frac{100 \cdot (100 - E)}{100 - E_{bias}} \quad 9. \text{ egyenlet}$$

ahol: E' : a torzult hatás (melyet a teszt agonistának tulajdonítunk, de valójában a teszt és a torzító agonista koncentrációk közös hatása); E : a torzítatlan hatás (a teszt agonista és a torzító agonista koncentrációk korrekt módon mért közös hatása); E_{bias} : az a hatás, melyet a torzító agonista koncentráció önmagában hoz létre (és amit figyelmen kívül hagyunk a torzult hatás meghatározásakor).

Ha egy rendszerben akutan megnő egy olyan anyag koncentrációja, ami valamely receptoron agonista, a 9. egyenletből kiindulva – bizonyos feltételek teljesülése – lehetőség nyílik az adott agonista többlet torzító agonista koncentrációként való meghatározására. A

meghatározáshoz legalább két E/c görbe felvétele szükséges: az első E/c görbét a torzító agonista koncentráció hiányában (torzítatlan görbe), a második E/c görbét pedig annak jelenlétében kell felvenni (torzult görbe). (A megbízhatóság növelése érdekében egyébként érdemes mindkét állapotban több mérést is elvégezni, így két E/c görbe helyett két E/c görbecsaládöt létrehozni. Ezeket a görbecsaládokat a jobb számítógépes programok képesek úgy kezelni, mint individuális E/c görbék csoportját, míg a gyengébbek számára átlagolni kell a görbecsaládokat és a két átlagolt E/c görbét felhasználni az RRM-hez.)

A torzító agonista koncentráció regresszióanalízissel való meghatározásához meg kell választani a hatás és az azt kiváltó agonista koncentráció közötti viszonyt definiáló általános receptorműködési modellt. Mivel mind az E, mind az E_{bias} torzítatlan hatás, alkalmas lehet bármelyik olyan modell, amely egzakt módon kvantifikálja a E/c viszonyt. A Hill egyenlet az egyik legegyszerűbb és legáltalánosabb ilyen modell, ami a receptorális hatást az agonista koncentrációra és három paraméterre (E_{max} , EC_{50} , n) vezeti vissza (Gesztelyi és mtsai, 2012; Finlay és mtsai, 2020).

Az RRM modell magvának tekinthető 9. egyenlet és a receptorfunkció általános, egyszerű leírását adó Hill egyenlet kombinálása révén a torzult hatás kifejezhető a torzító agonista koncentráció, a teszt agonista koncentráció, valamint a torzítatlan E/c kapcsolatot kvantifikáló E_{max} , EC_{50} és Hill koefficiens segítségével (Gesztelyi és mtsai, 2004; Greczer és mtsai, 2010a). A torzult hatást és a Hill egyenlet paramétereit biológiai mérésből kaphatjuk meg, előbbi egy torzult E/c görbéből (annak hatás értékeiként), míg utóbbiakat egy torzítatlan E/c görbe révén (amennyiben a két E/c görbe felvétele a torzító agonista koncentrációt leszámítva minden más körülményben megegyezik). Az RRM kombinált egyenlete, ha a későbbiekben csak a torzult E/c görbére akarjuk illeszteni, csak egy regressziós (vagyis variábilis) paramétert foglal magában, a torzító agonista koncentrációt. Ezt tehát úgy kaphatjuk meg, ha a kombinált egyenletet a torzult E/c görbére illesztjük úgy, hogy beleírjuk (fix értékeként) a torzítatlan E/c görbe Hill paramétereit. Ez egyben azt is jelenti, hogy az RRM-mel ily módon végzett koncentráció meghatározás feltétlenül igényli a torzítatlan E/c görbe felvételét ugyanabban a rendszerben (Gesztelyi és mtsai, 2004; Greczer és mtsai, 2010a).

A torzító agonista koncentrációját (c_{bias}) érdemes megkülönböztetni az RRM modell regressziós paraméterétől (c_x), mivel nem feltétlen ugyanarra az agonistára vonatkoznak és ezért számértékre sem egyeznek meg szükségszerűen. A fentiek alapján az RRM kombinált egyenlete (E és E_{bias} Hill egyenletből való kifejezésével):

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

ahol: E' : a torzult hatás (a c_{bias} -t figyelembe nem vevő módon kiszámolt hatás); c_{test} : a teszt agonista koncentráció (a E/c görbék felvétele során használt agonista koncentrációja); $E_{\max}$, EC_{50} és n : a torzítatlan E/c görbére illesztett Hill egyenlet paraméterei (a torzítatlan E/c kapcsolat empirikus leírói); c_x : a teszt agonista c_{bias} -szel ekvieffektív koncentrációja (így a c_x -hez és a c_{bias} -hez tartozó hatás egyenlő: $E_x = E_{\text{bias}}$).

A munkacsoport korábbi tapasztalatai és mások ajánlása (Motulsky és Christopoulos, 2004; Prism 8 Curve Fitting Guide, 2019) alapján az RRM modelljét (10. egyenlet) olyan formában érdemes illeszteni, ami a koncentráció jellegű mennyiségek logaritmusát tartalmazza. Munkánk során ezt az alakot illesztettük:

$$E' = 100 - \frac{100 \cdot \left(100 - \frac{E_{\max}}{1 + 10^{n \cdot (\log EC_{50} - \log(10^{\log c_x + 1} \log c_{\text{test}}))}} \right)}{100 - \frac{E_{\max}}{1 + 10^{n \cdot (\log EC_{50} - \log c_x)}}} \quad 11. \text{ egyenlet}$$

Az RRM alkalmazásához nem feltétel a teszt agonista és a torzító agonista egyezése, de az igen, hogy azonos hatást váltsanak ki a vizsgált biológiai rendszerben. Ha a teszt és a torzító agonista ugyanaz, az RRM által a regressziós paraméterre meghatározott érték magát a torzító agonista koncentrációt adja meg ($c_x = c_{\text{bias}}$). Ha nem, az RRM a teszt agonista torzító agonista koncentrációval ekvieffektív koncentrációját adja meg ($c_x \neq c_{\text{bias}}$, de $E_x = E_{\text{bias}}$) (Gesztelyi és mtsai, 2004; Greczer és mtsai, 2010a). Az, hogy az RRM tudja kezelni a torzító agonista és a teszt agonista eltérő voltát, lehetővé teszi, hogy egy rövid féléletidejű torzító agonista akut koncentráció-emelkedését egy stabil teszt agonista felhasználásával határozzuk meg (annak ekvieffektív koncentrációja formájában). Az RRM vitathatatlan előnye, hogy alkalmazásával olyan nehezen megközelíthető szöveti kompartment koncentráció-változásáról szerezhetünk információt, mint a receptorok agonista-kötőhelyének közvetlen környezete (Gesztelyi és mtsai, 2004; Karsai és mtsai, 2006, 2007).

Az RRM alkalmazásának több feltétele van, melyek teljesülése vagy kisebb-nagyobb sérülése hatással van a módszer pontosságára és megbízhatóságára (Gesztelyi és mtsai, 2004; Greczer és mtsai, 2010a, 2010b):

I. A mért hatás legyen jól meghatározható.

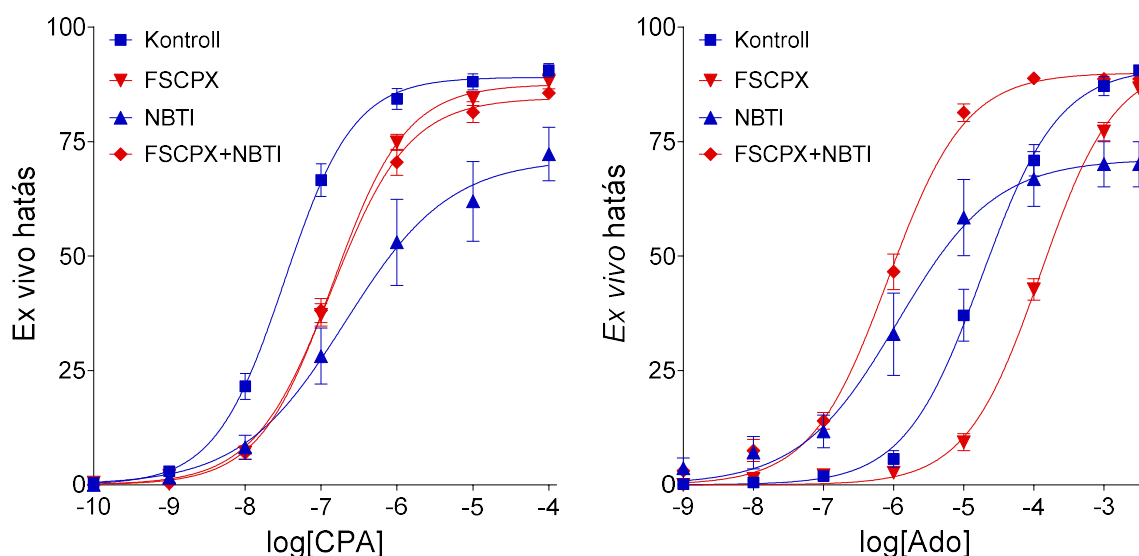
2. A teszt agonista eliminációja legyen lassú és penetráljon jól a vizsgált szövetekben.
3. A c_{bias} legyen állandó a torzult E/c görbe felvétele során.
4. Az E_{bias} a szemilogaritmikusan ábrázolt torzítatlan E/c görbén az alsó és felső görbület közötti, hozzávetőleg lineáris szakaszon helyezkedjen el.
5. A meghatározás során a receptorok érzékenysége ne változzon. Mivel erős (nagy intrinsic efficacy-vel rendelkező) agonista jelenlétében számítani lehet a receptorok érzékenységének csökkenésére, az RRM-mel akut koncentráció-növekedést érdemes meghatározni.
6. Ha a torzító agonista és a teszt agonista különbözik is, farmakodinámiás tulajdonságaik minél inkább hasonlítsanak egymásra.

2.3. Az *in silico* vizsgálat előzményei és célja

Izolált, ingerelt tengerimalac bal pitvaron (ami a myocardialis adenozinerg rendszer tanulmányozásának egyszerű és megbízható modellje) munkacsoportunk korábbi vizsgálatai (Kiss és mtsai, 2013; Pak és mtsai, 2014) során paradox jelenséget tapasztalt az FSCPX-szel kapcsolatban, melyet a szakmai közmegegyezés szelektív, irreverzibilis A_1 receptor antagonistának tart (Scammells és mtsai, 1994; Srinivas és mtsai, 1996; van Muijlwijk-Koezen és mtsai, 2001; Lorenzen és mtsai, 2002; Gesztelyi és mtsai, 2013). Nevezetesen azt, hogy NBTI jelenlétében az FSCPX előkezelés növelte az adenozin (az A_1 receptor endogén agonistája) által kiváltott maximális választ a koncentráció-hatás (E/c) görbék tanúsága szerint. A szerzők akkor ezt a jelenséget az alkalmazott E/c görbe kiértékelés és ábrázolási mód megtévesztő sajátosságnak tartották, melyet az NBTI által a szív interstitiumában felhalmozott endogén adenozin többlet okoz (Kiss és mtsai, 2013).

Munkacsoportunk tagjai egy későbbi vizsgálatukban (Zsuga és mtsai, 2017) *in silico* rekonstruáltak néhány E/c görbét az egyik fentebb említett korábbi vizsgálatból (Pak és mtsai, 2014). Különböző adenozin receptor agonisták szimulált E/c görbéinek viselkedése alapján feltételezték, hogy az FSCPX előkezelés megváltoztatja az NBTI hatását a E/c görbékre. Ennek mechanizmusaként felvetették, hogy az FSCPX úgy módosítaná az ENT1

(ekvilibratív és NBTI-érzékeny) nukleozid transzportert, hogy az megőrzi adenosin-áteresztő képességét, de az NBTI kevésbé fogja tudni gátolni (Zsuga és mtsai, 2017).



4. ábra. A CPA (nagy felezési idejű (Pavan és IJzerman, 1998), szintetikus A_1 adenosin receptor teljes agonista) és az adenosin (kis felezési idejű (Pavan és IJzerman, 1998), fiziológias A_1 adenosin receptor teljes agonista) izolált, ingerelt tengerimalac bal pitvaron felvett koncentráció-hatás (E/c) görbéi (a direkt negatív inotróp hatást mérve). A E/c görbék az NBTI (nukleozid transzport gátló) módosító hatását mutatják a CPA-ra és az adenosinra adott válasza FSCPX előkezelés hiányában (kék görbék) és megléte esetén (piros görbék). Az FSCPX-et mint irreverzibilis A_1 adenosin receptor antagonistát tartják számon. Az x tengely az adott agonista szervkádbeli moláris koncentrációjának negatív 10-es alapú logaritmusát mutatja, míg az y tengely a direkt negatív inotróp hatást (a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenéseként meghatározva). A szimbólumok a csoportonként átlagolt hatásokat mutatják ($\pm$ SEM), a vonalak pedig az illesztett Hill egyenletet. CPA: N^6 -cyclopentyladenosine; Ado: adenosin; FSCPX: 8-cyclopentyl- N^3 -[3-(4-(fluorosulfonyl)benzoyloxy)propyl]- N^1 -propylxanthine; NBTI: S-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine. Az adatok forrása: Erdei és mtsai, 2018.

Ezt követően a munkacsoporttal az FSCPX-nek ezt a feltételezett hatását vizsgáltuk meg izolált, ingerelt tengerimalac bal pitvaron (Erdei és mtsai, 2018). Ennek eredményei alapján (4. ábra, 1. táblázat) alkottunk meg azt a hipotézist, mely szerint az FSCPX előkezelés az NBTI-nek az adenosin receptor agonisták E/c görbéjére kifejtett két hatása közül csak azt gátolja, amit az endogén adenosin interstitialis koncentrációjának (NBTI okozta) növekedése mediál. Az NBTI másik hatását az exogén adenosin interstitialis koncentrációjának

emelkedése közvetíti (amennyiben kerül a rendszerbe exogén adenozin), amit új hipotézisünk szerint az FSCPX előkezelés változatlanul hagy. Mindezek hátterében, mint hatásmechanizmus, az állhat, hogy az FSCPX gátolja a szív interstitialis adenozin termelésében résztvevő valamelyik enzimet (Erdei és mtsai, 2018). Az FSCPX ezen tulajdonságát rajtunk kívül még senki sem vetette fel.

CPA	Kontroll	FSCPX	NBTI	FSCPX + NBTI
$E_{\max}$	89.21 ± 1.46	87.49 ± 1.75	71.68 ± 5.24	84.6 ± 1.64
$\log EC_{50}$	-7.47 ± 0.074	-6.85 ± 0.05	-6.53 ± 0.32	-6.86 ± 0.06
n	0.98 ± 0.03	0.93 ± 0.04	0.84 ± 0.09	0.86 ± 0.02
Ado	Kontroll	FSCPX	NBTI	FSCPX + NBTI
$E_{\max}$	91.04 ± 1	93.85 ± 1.78	71.23 ± 4.9	90.22 ± 1
$\log EC_{50}$	-4.74 ± 0.13	-3.88 ± 0.07	-5.92 ± 0.25	-6.08 ± 0.07
n	0.85 ± 0.03	0.83 ± 0.07	0.81 ± 0.13	0.83 ± 0.1

1. táblázat. A 4. ábra koncentráció-hatás (E/c) görbéinek Hill paraméterei. $E_{\max}$, $\log EC_{50}$, n (számtani közép $\pm$ SEM): az egyedi E/c görbékre illesztett Hill egyenlet regressziós paraméterei; SEM: standard hiba (standard error of the mean); a többi rövidítést illetően ld. a 4. ábrát. Az adatok forrása: Erdei és mtsai, 2018.

Az adenozin endogén ill. exogén eredete ebben a munkacsoport által használt kísérleti elrendezésben igen lényeges szempont, mivel az endogén ill. az exogén adenozin interstitialis szintjének emelkedése éppen ellentétes hatást fejt ki az adenozin E/c görbéjére (Kiss és mtsai, 2013; Pak és mtsai, 2014). Általánosságban az NBTI – a fiziológiás viszonyok között a cardiomyocyták belseje felé irányuló adenozin transzport gátlásával és ezáltal az adenozin intracelluláris eliminációjának kivédésével (Deussen és mtsai, 1999, 2006; Karsai és mtsai, 2006) – növeli az interstitialis adenozin koncentrációt, természetesen az adenozin eredetére való tekintet nélkül. A rendszerünkben jelentkező különbség oka, hogy NBTI jelenlétében az endogén adenozin még a E/c görbe felvétele előtt akkumulálódik az interstitiumban, míg az exogén adenozin szükségszerűen csak a E/c felvételekor jut a rendszerbe. Ebből következően a többlet endogén adenozin nem jelenik meg a E/c görbe X adataiban és az általa kifejtett receptoriális hatás is oly módon tükröződik a későbbi E/c görbe Y adataiban, hogy gyengül a E/c görbe felvételéhez használt agonista hatása (mivel kisebb a E/c görbe számára

rendelkezésre álló receptoriális válaszási kapacitás). Ennek következtében a többlet endogén adenzin jelenlétében felvett (adenozinerg) E/c görbe a kontroll körülmények között készíttetthez képest csökkent válaszkészséget mutat (kisebb E_{max} és nagyobb EC_{50}). Ezzel szemben, ha a E/c görbe adenzinnal kerül felvételre, az NBTI kivédi az exogén adenzin intracelluláris bontását, ezért az adenzin E/c görbe a kontroll görbéhez képest fokozott válaszkészséget sugall (valamivel nagyobb E_{max} és kisebb EC_{50} értékkel). Fontos leszögezni, hogy mindeközben a preparátumok tényleges A_1 adenzinerg válaszkészsége ugyanakkora (a kontroll értékkel megegyező), tehát az endogén ill. az exogén adenzin többlet valójában csak a hagyományos módon felvett és ábrázolt E/c görbéket torzítja (úgy, mintha az A_1 receptor válasz csökkenne ill. nőne).

PhD munkám során az első célom az FSCPX és az NBTI hatásai közötti interakció további részleteinek felderítése, valamint ezek fényében a korábbi idevágó *ex vivo* (Kiss és mtsai, 2013; Erdei és mtsai, 2018) és *in silico* (Zsuga és mtsai, 2017) vizsgálatok következtetéseinek újragondolása volt. Ehhez egy korábbi munkánk (Erdi és mtsai, 2018) nyolc E/c görbét vettük alapul (4. ábra, 1. táblázat), melyeket az új vizsgálatban *in silico* rekonstruáltunk. A E/c görbe szimuláció során különböző előfeltevések alapján különböző modelleket hoztunk létre, majd ezeket összehasonlítottuk az eredeti (*ex vivo*) E/c görbékkel. Mivel a receptoriális válaszkészség módszer (RRM) figyelembe tudja venni az endogén ill. az exogén adenzin hatásai közötti különbséget (a fentebbi vizsgálatok kísérleti körülményei között; Gesztelyi és mtsai, 2004; Greczer és mtsai, 2010a, 2010b), ezt a módszert is felhasználtuk az FSCPX-NBTI paradoxon feltárását célzó új vizsgálataink során.

2.4. Az *ex vivo* vizsgálat előzményei és célja

Az RRM elméleti hátterét a receptorelmélet, a farmakológia legjellegzetesebb szellemi vívmánya képezi (Ruffolo, 1982; Rang, 2006; Finlay és mtsai, 2020). A receptorelmélet nagy előnye, hogy számos, kvantitatív meghatározásra alkalmas módszert alapoz meg teoretikusan (Colquhoun, 2006). Receptorok, ligandok, sejt-, szövet- illetve teljes test-szintű működések állandóit (és néha változó paramétereit) többféle megközelítéssel is meg lehet határozni. Ennek egyik lehetősége olyan, a kérdéses állandókat illetve paramétereket tartalmazó egzakt modellek (egyenletek) kifejlesztése, amelyeket megfelelően előkészített, biológiai mérésekből származó adatokra lehet illeszteni és ezzel előbbieket értékét

megbecsülni (Giraldo és mtsai, 2002; Gesztelyi és mtsai, 2012; Roche és mtsai, 2014; Kenakin, 2018). Az első kvantitatív receptor modellnek a Hill egyenlet tekinthető, ami eredetileg az egyszerű ligandkötés kinetikájának leírására szolgált (Hill, 1910). A kiváltott hatást a koncentrációhoz három állandó segítségével kapcsoló Hill egyenlet az alapja a receptorműködés minden továbbfejlesztett kvantitatív (vagy szemikvantitatív) modelljének (Colquhoun, 2006; Gesztelyi és mtsai, 2012; Goutelle és mtsai, 2008), mint például a széles körben használt operatív modellnek (Black és Leff, 1983) és a legújabb SABRE (Signal Amplification, Binding affinity and Receptor activation Efficacy) modellnek (Buchwald, 2019, 2020). Más modellek célja speciális problémák megoldásában való segítség. Ilyen az RRM is, ami a Hill egyenletet egy olyan összefüggéssel kombinálja, amely egy (vagy két) agonista két koncentrációja és az általuk kiváltott szimultán hatások közötti kapcsolatot írja le, amennyiben az egyik koncentráció ismert, a másik viszont nem (c_x). Az RRM ennek a c_x -nek a meghatározására alkalmas a receptorai mikrokörnyezetében (bizonyos körülmények között, pl. ha a c_x mint akut koncentráció-növekedés jelentkezik a rendszerben) (Gesztelyi és mtsai, 2004). Fontos, hogy az RRM modelljét megbízható adatokra illesszük, az illesztés pedig technikailag megfelelően legyen kivitelezve.

Az RRM egy egyszerű nemlineáris regresszió alapuló eljárás, melynek modellje két változót (X , Y) és (legalább) egy meghatározandó paramétert (c_x) tartalmaz (Gesztelyi és mtsai, 2004). A modell illesztése két garnitúra E/c görbe felvételét igényli. Az RRM számára megfelelő E/c görbék olyan XY gráfok, ahol X az agonista koncentráció (logaritmusa), Y pedig a biológiai rendszer válasza, melyet a hozzá tartozó X koncentráció váltott ki egyedül (első garnitúras E/c görbe) vagy egy egyszeri (állandó nagyságú) többlet koncentrációval közösen, ami ugyanahhoz vagy egy másik agonistához tartozik és ami közvetlenül a E/c görbe felvétele előtt került a rendszerbe (második garnitúras E/c görbe). Az RRM kivitelezése ennek az egyszeri többlet koncentrációnak a (c_x -ként való) meghatározását célozza (Gesztelyi és mtsai, 2004; Karsai és mtsai, 2006, 2007).

Noha a második garnitúras E/c görbe a két koncentráció eredő hatását kizárólag a E/c görbe felvételéhez használt agonista koncentrációhoz rendeli (az X értékhez), az RRM modellje az eredő hatást két koncentrációval kapcsolja össze, méghozzá a E/c görbe felvételéhez használt agonista két koncentrációjával. Az egyik ezek közül az aktuális X érték, a másik pedig a E/c görbe felvételéhez használt agonista azon koncentrációja (c_x), ami ekvieffektív a meghatározandó egyszeri, többlet agonista koncentrációval. Ha a két koncentrációhoz tartozó agonisták azonosak, a c_x valós koncentráció, ha nem, a c_x a másik

agonista egyszeri, többlet koncentrációjának helyettesítő paramétere (Grenczer és mtsai, 2010a, 2010b). Az RRM alkalmazására akkor a leghasznosabb, ha a kérdéses többlet agonista koncentráció ismeretlen és más módon való meghatározása nehézségbe ütközik (Karsai és mtsai, 2006, 2007). Mivel a többlet agonista koncentráció torzítja a második garnitúrás E/c görbét a neki megfelelő első garnitúráshoz képest (amit mindenben hasonló körülmények között vettek fel, kivéve a többlet agonista koncentrációt), a továbbiakban torzító koncentrációként hivatkozunk rá.

Az RRM tehát egy adott receptorpopuláció mikrokörnyezetében levő valamely agonista koncentrációjában beállt akut növekedés kimutatására és – bizonyos korlátok között – meghatározására alkalmas. Fontos leszögezni, hogy a receptorok mikrokörnyezete más módszerekkel nehezen vizsgálható szöveti kompartment, különösen mozgó szervekben, illetve bomlékony agonisták esetén (Gesztelyi és mtsai, 2004; Karsai és mtsai, 2006, 2007). Elméletileg az RRM minden receptor esetében alkalmazható, az A₁ receptor azonban különösen alkalmas erre a vizsgálatra, köszönhetően lassú és inkomplett deszenzitizációjának akár teljes agonista tartós jelenléte mellett is (Fredholm és mtsai, 2001; Mundell és Kelly, 2011).

A regresszióanalízis (különösen a nemlineáris) az egyik legelterjedtebb módja a E/c görbék elemzésének, melynek segítségével sok olyan értékes információ szerezhető a receptorok, a ligandok és az általuk befolyásolt sejtfunkciók tulajdonságairól, melyeket más módon nehezen lehetne megszerezni (Motulsky és Christopoulos, 2004; Prism 8 Curve Fitting Guide, 2019; McDonald, 2009). A regresszió (görbeillesztés) célja meghatározni a modell paramétereinek legmegfelelőbb értékeit és ezáltal megszerkeszteni a legjobban illeszkedő regressziós függvényt (görbét), amelyik a legközelebb fut az adatpontokhoz (a tipikusan ismételt mérések révén beszerzett XY adatokhoz). A regressziós paraméterek optimális értékeit a legrégebben és máig a leggyakrabban az ún. legkisebb négyzetek elve alapján határozzák meg. Ennek lényege, hogy minimalizálják az adatpontok görbétől mért távolsága függőleges komponensei négyzeteinek összegét. A módszer – gyakorlati szempontból – két legfontosabb feltételezése:

1. normalitás, vagyis az azonos X értékhez tartozó adatpontok (Y replikátumok) szórása a regressziós görbe ugyanazon X-hez tartozó Y értéke körül Gauss-féle eloszlást követ;

2. homoszkedaszticitás, vagyis az előbbi szórás mértéke azonos az összes X-re nézve (Motulsky és Christopoulos, 2004; Prism 8 Curve Fitting Guide, 2019; McDonald, 2009).

Ad 1. Gauss eloszlás feltételezése és ennek megfelelően hagyományos regresszió (ordinary regression) kivitelezése a legtöbb, biológiai mintán végzett vizsgálatból származó adathalmaz esetében célravezető választás. Mindazonáltal Lorentz eloszlás feltételezése és ezért robusztus regresszió (robust regression) alkalmazása a görbeillesztést érzéketlenebbé teszi a kiugró értékek torzító hatásával szemben, igaz, emiatt elvész a meghatározás megbízhatóságát jellemző számítások elvégzésének lehetősége, így a regressziós paraméterekre kapott értékekhez nem kapunk standard hibát, konfidencia intervallumot, illetve konfidencia vagy predikciós sávokat (confidence or prediction bands). Bizonyos esetekben megfontolás tárgya lehet Poisson eloszlás feltételezése és ebből kiindulva Poisson regresszió kivitelezése. Mivel Poisson regresszió nem végezhető normalizált Y adatokon, a mi vizsgálataink során nem merült fel az alkalmazása. A Gauss illetve a Lorentz eloszlás egyaránt lehetővé teszi a legkisebb négyzetek elvének alkalmazását, amit megmagyaráz, hogy mindkettő t eloszlás, méghozzá annak két szélső esete (végtelen illetve 1 szabadsági fok mellett, a felsorolás sorrendjében). Ezzel szemben a Poisson eloszlást feltételező Poisson regresszió speciális elméleti megközelítést igényel (maximum likelihood-based parameter estimation; Motulsky és Christopoulos, 2004; Prism 8 Curve Fitting Guide, 2019).

Ad 2. A heteroszkedaszticitás okozta torzítás ellensúlyozására a legkisebb négyzetek elvén alapuló módszer standard egyenlete különböző tényezőkkel módosítható, melyet súlyozásnak hívnak. A leggyakoribb ilyen tényező az $1/Y^2$ (relatív súlyozás) és az $1/|Y|$ (Poisson súlyozás). A relatív súlyozás és – kisebb mértékben – a Poisson súlyozás csökkenti a nagyobb Y értékek befolyását a regressziós paraméterek értékére és a regressziós görbére. Emellett a Poisson súlyozás (hagyományos regresszióval kombinálva) a Poisson regresszió kényszer szülte alternatívájaként is szolgálhat. További lehetőség az elméleti megfontolások alapján ígéretesnek tűnő, de a gyakorlatban ritkán használt súlyozás $1/SD^2$ -tel (vagyis az ugyanazon X értékekhez tartozó Y értékek varianciájának reciprokával), ami a többiekénél nagyobb szórású Y replikátumok indokolatlanul nagy súlyának csökkentését célozza (Motulsky és Christopoulos, 2004; Prism 8 Curve Fitting Guide, 2019).

Görbét (azaz egy egyenletet) általában individuálisan illesztnek, vagyis a regressziós paraméterek értékeit egyetlen adathalmazra határozzák meg. Ez lehet egyetlen E/c görbe, de a mai technikai és szoftveres lehetőségek mellett lehet E/c görbék egy csoportja, amelyben a görbék ismételt mérésekből származnak (azaz ugyanazt az információt hordozzák – természetesen random hibával terhelt). A görbeillesztés fejlettebb módja a globális illesztés, amikor is a regressziós modell (tehát az illesztett egyenlet) egy görbecsaládot

határoz meg, vagyis olyan függvényeket, amelyeknek néhány (minimum 1) paramétere közös (tehát ugyanazt az értéket veszi fel minden görbe esetében). Globális regresszió során egyszerre több adathalmazra történik a görbecsalád illesztése, és a művelet precizitását (precision) egyetlen négyzetösszeg jellemzi (Motulsky és Christopoulos, 2004; Prism 8 Curve Fitting Guide, 2019).

PhD munkám során a második célom az volt, hogy feltárjam a különböző görbeillesztési módok (individuális vagy globális) és görbeillesztési beállítások (melyek az Y értékekre különböző eloszlásokat illetve szórási mintázatokat feltételeznek) hatását az RRM által szolgáltatott eredményekre. Az ennek felderítését célzó kísérletek során minden mintán két E/c görbét vettünk fel. Az elsőt adenzinnal, melynek szerepe a felhasznált tengerimalac bal pitvarok A₁ receptor stimulációra adott natív válaszainak felmérése volt. Az adenzin különösen alkalmas erre a célra, mivel gyorsan és zavaró metabolitok keletkezése nélkül eliminálódik a rendszerből (Wilbur és Marchlinski, 1997). A második E/c görbéhez három, széles körben használt, az adenzinnál stabilabb, szintetikus A₁ receptor agonista (CPA, NECA, CHA) egyikét használtuk, még hozzá ugyanazon agonista egyetlen torzító koncentrációjának hiányában illetve jelenlétében. Az RRM pontosságát (accuracy) és precizitását (precision) az ismert nagyságú torzító koncentráció meghatározásával vizsgáltuk jól bevált izolált, ingerelt tengerimalac bal pitvar modellünkön. A torzító koncentrációhoz és a E/c görbe felvételéhez használt agonista azonosságából következően az RRM által szolgáltatott c_x becslés közvetlenül a torzító koncentrációt adta meg.

Ezen vizsgálatunk során is az A₁ receptor agonisták által kiváltott negatív inotrópiát határoztuk meg, mint hatást. A kamrai myocardium nyugalmi kontrakciós erejét a legtöbb emlősben nem csökkenti az A₁ receptor, csak az emelkedett intracelluláris cAMP-szint miatti fokozott kontraktilitást viszi vissza a nyugalmi szintre (Endoh, 1987). Az emlős pitvari myocardiumban ugyanakkor az A₁ receptor aktiváció a nyugalmi kontrakciós erőt is képes csökkenteni (még hozzá jelentős mértékben), amit direkt negatív inotróp hatásnak nevezünk (Kurachi és mtsai, 1986; Endoh, 1999). Mivel *ex vivo* kísérleteink során ingerelt bal pitvart használtunk, az A₁ receptor-mediálta negatív tróp-hatások egyedül mint a nyugalmi kontrakciós erő csökkenése juthattak érvényre. Ennek fontos szerepe van kísérleti adataink megbízhatóságát és jó interpretálhatóságát illetően, mivel a direkt negatív inotrópia egyébként érzékeny az összehúzódások frekvenciájában beálló változásokra (Belardinelli és mtsai, 1995).

3. Anyagok és módszerek

3.1. *In silico* módszerek

3.1.1. Az izolált, ingerelt tengerimalac bal pitvari myocardium adenzin homeosztázisának és a kontraktilitását érintő A_1 adenzinerg szabályozás számítógépes szimulációja

Az A_1 receptor agonisták hatását az izolált, ingerelt tengerimalac bal pitvar kontrakciós erejére *in silico* E/c görbékkel modelleztük. A szimulált E/c görbék előállításához az agonizmus operatív modelljét alkalmaztuk, ami képes kezelni egy agonista hatását (7. egyenlet; Black és Leff, 1983) és két agonista egyidejű hatását is (12. egyenlet; Leff és mtsai, 1993). Az operatív modell általános és kvantitatív módon írja le a kapcsolatot egy (vagy két) agonista koncentrációi és az általuk kiváltott receptoriális válaszok között. A modell tartalmazza mindazon paramétereket, amelyek szükségesek az FSCPX és az NBTI hatásának figyelembevételéhez (a működőképes receptorok koncentrációja, két különböző agonista egyidejű jelenléte) (Black és Leff, 1983; Leff és mtsai, 1993; Giraldo és mtsai, 2002).

Az exogén és endogén eredetű adenzin eltérő hatásait a munkacsoport saját fejlesztésű eljárásával modelleztük (Zsuga és mtsai, 2017), ami az RRM (Gesztelyi és mtsai, 2004; Grenzer és mtsai, 2010a) alkalmazásán alapul (13. egyenlet). Ezen eljárással két, egyidőben jelen lévő agonista (ugyanazon a receptor populáción kifejtett) együttes hatását szimuláltuk abban a speciális esetben, amikor a magát egyetlen koncentrációval képviseltető egyik agonistát és annak hatását figyelmen kívül hagytuk (és ezáltal torzult hatásokat detektáltunk). A figyelembe nem vett agonista koncentráció modellezte az NBTI által felhalmozott endogén adenzin okozta interstitialis adenzin koncentráció többletet, ami már az (exogén) adenzinnal illetve CPA-val való E/c görbe felvétel előtt kialakult a rendszerben.

A kiindulási adatok (2. táblázat) és feltételezések változtatásával négy modellt és a 4. modellhez két kiegészítő variánst határoztunk meg, melyek segítségével hat E/c görbe készletet szerkesztettünk. Mindegyik görbe készlet nyolc E/c görbét tartalmazott, melyek közül négy egy bizonyos „A” agonistához köthető, négy pedig egy „C” agonistához (ld. később). A szimulált E/c görbék jellemzését és megjelenítését a Hill egyenlet (3. egyenlet) egy alkalmas formájának (14. egyenlet) illesztésével biztosítottuk.

Az A_1 receptor endogén agonistájának, az adenzinnak a szervkádban működtetett tengerimalac bal pitvarszövetben mutatott sajátosságait a szimuláció „A” agonistájával vettük figyelembe. Lokalizáció alapján két A agonista koncentrációt különböztettünk meg, egy „szervkádbeli” és egy „receptorközei” koncentrációt. Eredet szempontjából kétféle A agonistát modelleztünk, „exogén” (a E/c görbe felvétele során beadott) és „endogén” (a pitvari myocardiumban keletkező) A agonistát.

Az adenzin sejtbe irányuló transzportját eltérően modelláltuk az exogén és az endogén A agonista esetében. Transzport inhibitor hiányában a „szervkádbeli” A agonista koncentrációt 400-zal elosztottuk, mielőtt a hozzá tartozó hatást kiszámoltuk volna. (Ez megfogalmazható úgy is, hogy a hatást mindig a „receptorközei” koncentrációból számoltuk, ami A agonista esetében, ha nem volt jelen transzport gátló, a „szervkádbeli” koncentráció 1/400-ad része volt.) Ez az eljárás azt szimulálta, hogy *in vivo* illetve *ex vivo* egy, a sejtek által gyorsan inkorporált agonista koncentrációja a sejtfelszíni receptorai közelében kisebb, mint a vérplazmában vagy a szervkád folyadékában. Transzport inhibitor jelenlétében ugyanakkor a „szervkádbeli” A agonista koncentrációt nem osztottuk el a hatás kiszámolása előtt, vagy ha mégis, akkor egy 400-nál sokkal kisebb számmal (6-tal vagy 6·14.8952-vel, ennek magyarázatát ld. később). Ezzel szemben az endogén adenzin többlet interstitialis koncentrációját (ami transzport gátló jelenlétében halmozódik fel) mint az A agonista egy c_{bias} koncentrációját vettük figyelembe, melynek értékét vagy önkényesen állapítottuk meg, vagy a legutóbbi *ex vivo* vizsgálatunk (Erdei és mtsai, 2018) adatait használtuk fel (2. táblázat). Minden c_{bias} beszámításával megszerkesztett E/c görbe (vagyis minden, transzport gátló jelenlétét szimuláló E/c görbe) „torzult” minősítést kapott. Ezzel azt szimuláltuk, hogy a c_{bias} és az általa kiváltott hatás figyelmen kívül lett hagyva a nyers E/c görbe adatok feldolgozásakor. (Valóban ez a helyzet olyan E/c görbe adatok hagyományos kiértékelésekor, ahol pl. egy transzport gátló hatására felszaporodik egy olyan endogén agonista a rendszerben, ami befolyásolja a mért hatást.)

A szintetikus A_1 receptor agonista CPA tulajdonságait az izolált, ingerelt tengerimalac bal pitvaron a szimuláció C agonistájával modelleztük. A CPA enzimekkel szembeni fokozott rezisztenciáját megjelenítendő a C agonista „szervkádbeli” és „receptorközei” koncentrációját egyenlőnek vettük. Ennek megfelelően a C agonista „szervkádbeli” koncentrációját sosem osztottuk el, amikor az általa kiváltott hatást számoltuk ki.

Az irreverzibilis A₁ receptor antagonist FSCPX-et a szimuláció során az X vegyület reprezentálta. Az X vegyülettel végzett előkezelés hatását a teljes receptor koncentráció ([R₀]) 5.556-tal való elosztásával vettük figyelembe (2. táblázat), ami az A₁ receptorok 18%-ának épen maradását szimulálta, összhangban a munkacsoport korábbi eredményeivel (Gesztesy és mtsai, 2013). A 4. modell (és variánsai) esetében, amennyiben transzport gátló volt jelen, az X vegyülettel való előkezelést egy további művelettel is figyelembe vettük, és pedíg a c_{bias} értékének megváltoztatásával (2. táblázat). Ezen túl a 4. modell 2. variánsában, ha transzport inhibitor volt jelen, az X vegyülettel végzett előkezelést egy harmadik művelettel is figyelembe vettük, méghozzá egy 14.8952-vel való osztással az exogén A agonista „receptorközei” koncentrációjának kiszámolásakor (2. táblázat).

	1. modell	2. modell	3. modell	4. modell
E _m	100	99		90
n _{op}			75	
[R ₀]		10 ⁻¹⁰ (Ko) 1.8 × 10 ⁻¹¹ (X)		
K _A		3 × 10 ⁻⁵		
K _E		10 ⁻¹³		
c _{bias}	2.5 × 10 ⁻⁶ (NB és X+NB)		1.002 × 10 ⁻⁷ (NB és X+NB)	1.002 × 10 ⁻⁷ (NB) 6.727 × 10 ⁻⁹ (X+NB)

2. táblázat. Az *in silico* vizsgálat négy modelljét meghatározó paraméterek. Ko: kontroll (előkezelés illetve kezelés nélküli); X: X vegyülettel való előkezelés; NB: NB vegyülettel való kezelés; X + NB: X vegyülettel való előkezelés, majd NB vegyülettel végzett kezelés (röviden: X + NB kezelés). Az első oszlop rövidítéseit illetően ld. a 7. és a 12. egyenletet.

A nukleozid transzportot (pontosabban annak ENT1 típusát) gátló NBTI szimulációnkban mint NB vegyület jelent meg. Ennek jelenlétét egyrészt az exogén A agonista „szervkádbeli” koncentrációjának elosztásával vettük figyelembe (ld. fentebb), másrészt egy c_{bias} paraméter bevezetésével, ami az endogén A agonista interstitialis (ily módon „receptorközei”) koncentráció-növekménye. A kezdeti modellek (1-3.) csak egyféle c_{bias}-t tartalmazhattak, míg a végső (4.) modellben és két variánsában a c_{bias} két értéket is felvehetett: egyet a csak NB vegyülettel való kezeléskor, egy másikat pedig az X+NB kezelés esetén. Az 1. és 2. modellben a c_{bias} értéke önkényes volt, a 3. és 4. modellben viszont a legutóbbi *ex vivo* vizsgálatunk során (Erdei és mtsai, 2018) meghatározott többlet interstitialis adenosin koncentrációk (2. táblázat). Mint már fentebb is utalás történt rá, a 4.

modellben és variánsaiban interakciót feltételeztünk az X vegyülettel való előkezelés és az NB vegyülettel való kezelés között.

Az eredmények bemutatásakor a szimulált E/c görbék hatás értékeit mindig az adott exogén agonista „szervkádbeli” koncentrációinak függvényében ábrázoltuk. Ez összhangban áll azzal a ténnyel, hogy *ex vivo* adatokat megjelenítő E/c görbék esetén is rendszerint ezek a koncentráció értékek ismertek.

3.1.2. Az egyszerű (egyetlen agonista hatását konvencionális módon kifejező) koncentráció-hatás görbék felvétele

Az exogén A illetve C agonista által kiváltott hatás értékeket az agonizmus operatív modellje (7. egyenlet) alapján határoztuk meg. Az agonisták „receptorközei” koncentrációit írtuk be a 7. egyenletbe, melyeket a „szervkádbeli” koncentrációkból számoltuk ki (a fentiekben megadott módon). Az exogén A és C agonista „szervkádbeli” koncentrációi 10^{-10} – $10^{-2.5}$ mól/l között voltak (felező logaritmikus lépésekre egymástól) a szimuláció során. A szimulálandó nyolc E/c görbe (4. ábra) legutóbbi *ex vivo* munkánkból származott (Erdei és mtsai, 2018), az ezekkel való minél jobb összehasonlíthatóság érdekében az A illetve a C agonista E/c görbéit csak azokban a koncentráció-tartományokban ábrázoltuk, amelyekben az adenzin illetve a CPA E/c görbéket felvettük (4. ábra).

Az X vegyülettel végzett előkezelést az $[R_0]$ paraméter 10^{-10} -ról $1.8 \cdot 10^{-11}$ -re való csökkentésével fejeztük ki. Ez összhangban volt a munkacsoport korábbi *ex vivo* eredményével, mely szerint a tengerimalac bal pitvari A_1 receptorok mintegy 10-20%-a maradt funkcióképes 45 perc $10 \mu\text{mol/l}$ FSCPX inkubáció, majd 75 perc mosás után (Gesztelyi és mtsai, 2013). Az operatív modell többi paraméterének értékét az *in silico* vizsgálat során éppen tesztelt modellhez (1-4.) önkényesen választottuk meg (2. táblázat).

3.1.3. Az összetett (két agonista közös hatását az egyik figyelmen kívül hagyása mellett kifejező) koncentráció-hatás görbék felvétele

Az endogén A agonista NB vegyület jelenlétében létrejött koncentráció-többlete (C_{bias}) és az exogén A vagy C agonista növekvő koncentrációi (C_{test}) által közösen kiváltott, torzult hatás értékeket két lépésben számoltuk ki. Először a még nem torzult hatás értékeket határoztunk meg a következő egyenlet (Leff és mtsai, 1993) segítségével:

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

ahol: E: a még nem torzult hatás; E_m : az adott rendszerben elérhető maximális hatás; c_{bias} : endogén A agonista koncentráció-többlete (természetszerűleg receptorközei koncentráció); c_{test} : az exogén A vagy C agonista receptorközei koncentrációja; K_{bias} illetve K_{test} : a c_{bias} illetve a c_{test} agonistáihoz tartozó K_A értékek (ld. 5. egyenlet); τ_{bias} illetve τ_{test} : $[R_0]/K_{E_{\text{bias}}}$ illetve $[R_0]/K_{E_{\text{test}}}$, ahol a $K_{E_{\text{bias}}}$ illetve a $K_{E_{\text{test}}}$ a c_{bias} illetve a c_{test} agonistáihoz tartozó K_E értékek (ld. 6. egyenlet); n_{op} : az operatív slope faktor.

Ezt követően a még nem torzult hatás értékeket torzítottuk a következő összefüggés felhasználásával (Gesztelyi és mtsai, 2004; Greczner és mtsai, 2010a):

$$E' = 100 - \frac{100 \cdot (100 - E)}{100 - E_{\text{bias}}} \quad 13. \text{ egyenlet}$$

ahol: E' : a torzult hatás; E: a 12. egyenlet által szolgáltatott nem torzult hatás; E_{bias} : a c_{bias} által kiváltott hatás (melyet a 12. egyenlettel számoltunk ki oly módon, hogy a c_{test} paraméterhez 0 értéket rendeltünk, miközben minden további paraméter ugyanazt az értéket kapta, mint az adott E_{bias} -hoz tartozó E).

A 13. egyenlettel való torzítás a c_{bias} (és az általa kiváltott hatás, E_{bias}) meglétét, de figyelmen kívül hagyását szimulálta egy hagyományos *in vivo* vagy *ex vivo* E/c görbe felvétel és kiértékelés során. Fontos leszögezni, hogy a c_{bias} jelenlétében felvett E/c görbék is torzítatlanul tükröznék a 12. egyenlet által bemutatott koncentráció-hatás kapcsolatot, ha az adott helyzetre szabva értékelnék ki ezeket. A c_{bias} (és az E_{bias}) azonban általában ismeretlenek és (ha a létezésüket gyanítják is) figyelmen kívül hagyottak. A 13. egyenlettel kiszámolt torzult hatásokat (a szimulált valós helyzetekkel összhangban) a c_{test} értékeket szolgáltató agonista „szervkádbeli” koncentrációinak függvényében ábrázoltuk.

3.1.4. A szimulált koncentráció-hatás görbék jellemzése

A szimulált E/c görbékre a Hill modellt (3. egyenlet) illesztettük, az ajánlásnak megfelelően (Motulsky és Christopoulos, 2004) a következő formában (ugyanazon okból, amiért máshol a 11. egyenletet illesztettük a 10. helyett):

$$E = \frac{E_{\text{max}}}{1 + 10^{n \cdot (\log EC_{50} - \log c)}} \quad 14. \text{ egyenlet}$$

Mivel a 14. egyenletet illesztésre (és nem E/c görbe adatok kiszámolására) használtuk, a benne szereplő c paraméter a görbe felvételére használt agonista „szervkádbeli” koncentrációját jelenti. Ez megfelel az *in vivo* és *ex vivo* kísérleti eredmények feldolgozásakor alkalmazott görbeillesztési gyakorlatnak.

3.1.5. Az *ex vivo* rendszer *in silico* modelljének fejlesztése

In silico vizsgálatunk kiindulási modellje a munkacsoport ezt megelőző *in silico* munkájának (Zsuga és mtsai, 2017) kiindulási modellje volt. A modell paramétereit úgy változtattuk, hogy a nyolc *in silico* E/c görbe minél nagyobb mértékben hasonlítson a szimulálandó *ex vivo* E/c görbékre (4. ábra). Ennek a folyamatnak hat állomását mutatjuk be az eredmények között, mint négy modellt és két kiegészítő variánst a 4. modellhez.

Az A és C agonista ugyanazokkal a sajátosságokkal rendelkezett mindegyik modellben, kivéve a sejtek belsejébe irányuló transzportot (és az ezt fenntartó intracelluláris eliminációt). Ez csak az A agonistát érintette oly módon, hogy „szervkádbeli” és „receptorközei” koncentrációja különbözhetett, továbbá ez a különbség függött az NB vegyület jelenlététől.

A kiválasztott *ex vivo* E/c görbék (forrás: Erdei és mtsai, 2018) 1. *in silico* modelljében az NB vegyületről feltételeztük, hogy teljesen leállítja az A agonista transzportját (amit azzal vettünk figyelembe, hogy az A agonista „szervkádbeli” koncentrációjának kiszámolásakor elhagytuk a 400-zal való osztást, amikor meghatároztuk az A agonista „receptorközei” koncentrációját). Az endogén és exogén A agonistát teljesen külön kezeltük (mint minden modellben, kivéve a 4. modell 2. variánsát). Az 1. modellben egyetlen (önkéntes) c_{bias} értéket használtunk, vagyis nem feltételeztünk interakciót az X és az NB vegyület hatásai között (2. táblázat).

A 2. *in silico* modell az 1. modellből származott egy módosítás révén, nevezetesen az E_m értékét 100-ról 99-re csökkentettük (2. táblázat).

A 3. *in silico* modell az első két modellből származott három változtatás révén. Először is az E_m paraméter értékét 90-ben határoztuk meg. Másodszor, az NB vegyület hatását egyetlen c_{bias} értékkel vettük figyelembe, ami a legutóbbi *ex vivo* vizsgálat (Erdai és mtsai, 2018) azon c_x értéke volt, melyet csak NBTI jelenlétében határoztunk meg (FSCPX nélkül). Ez azt jelenti, hogy itt sem feltételeztünk interakciót az X és az NB vegyület hatásai

között (2. táblázat). Harmadszor, feltételeztük, hogy az NB vegyület csak lassítja az A agonista transzportját. Ezt úgy modelleztük, hogy az A agonista „szervkádbeli” koncentrációját 6-tal osztottuk el (400 helyett) a „receptorközei” koncentráció kiszámolásakor.

A 4. *in silico* modell a 3.-tól abban különbözött, hogy a korábbi *ex vivo* vizsgálat (Erdei és mtsai, 2018) mindkét c_x értékét bevezettük, mint c_{bias} -t (az NB kezeléshez a csak NBTI jelenlétében mért c_x -et, az X+NB kezeléshez az FSCPX előkezelést követő NBTI kezelés során mértet). Ezzel interakciót feltételeztünk az X és az NB vegyület hatásai között (2. táblázat).

A 4. modell 1. variánsában (a 4. modelltől eltérően) azt feltételeztük, hogy NB vegyület jelenlétében nincs A agonista transzport (akárcsak az 1. és 2. modellben). Ennek megfelelően az NB-kezelt és az X+NB-kezelt E/c görbék esetében az A agonista „szervkádbeli” koncentrációi egyenlők voltak a nekik megfelelő „receptorközei” koncentrációkkal.

A 4. modell 2. variánsában (a 4. modell többi feltételezésének megtartása mellett) úgy tekintettük, hogy az X vegyület befolyásolja az NB vegyület hatását mind az endogén, mind az exogén A agonista koncentrációjára (és nem csak az endogénre). A modellvariáns ezen tulajdonsága a munkacsoport egy korábbi hipotézisét jelenítette meg, mely szerint az FSCPX az ENT1 módosításán keresztül lépne interakcióba az NBTI-vel (Zsuga és mtsai, 2017). Az X vegyület befolyásának nagyságát az exogén A agonista koncentrációjára – némileg önkényesen – úgy vettük figyelembe, hogy az A agonista X+NB-kezelt E/c görbéjének „receptorközei” koncentrációit az A agonista csak NB-kezelésű E/c görbéjének „receptorközei” koncentrációiból számoltuk ki úgy, hogy azokat 14.8952-vel elosztottuk. 14.8952 a 4. modell két c_{bias} értékének hányadosa.

3.2. Anyagok és *ex vivo* módszerek

3.2.1. Vegyszerek és oldatok

A preparátumok közegeként, az adenoazin feloldásához és a többi vegyület törzsoldatának hígításához Krebs-Henseleit puffert (Krebs-oldat) használtunk. Az általunk

alkalmazott Krebs-oldat összetétele (mM-ban): NaCl: 118, KCl: 4.7, CaCl₂: 2.5, NaH₂PO₄: 1, MgCl₂: 1.2, NaHCO₃: 24.9, glükóz: 11.5, aszkorbinsav: 0.1 (bidesztillált vízben).

Az általunk használt vegyszerek: adenzin, CPA (N⁶-cyclopentyladenosine), NECA (5'-(N-ethylcarboxamido)adenosine) és CHA (N⁶-cyclohexyladenosine), melyeket a Sigma-tól (St. Louis, MO, USA) szereztünk be. Az adenzint 36°C-os Krebs-oldatban oldottuk fel. A CPA-t, NECA-t és CHA-t 1:4 etanol:víz (v/v) elegyben oldottuk (az etanol koncentrációja nem haladta meg a 0.23%-ot (v/v) a szervkádakban). Minden törzsoldat koncentrációja 10 mM volt.

3.2.2. Állatok és preparátumok

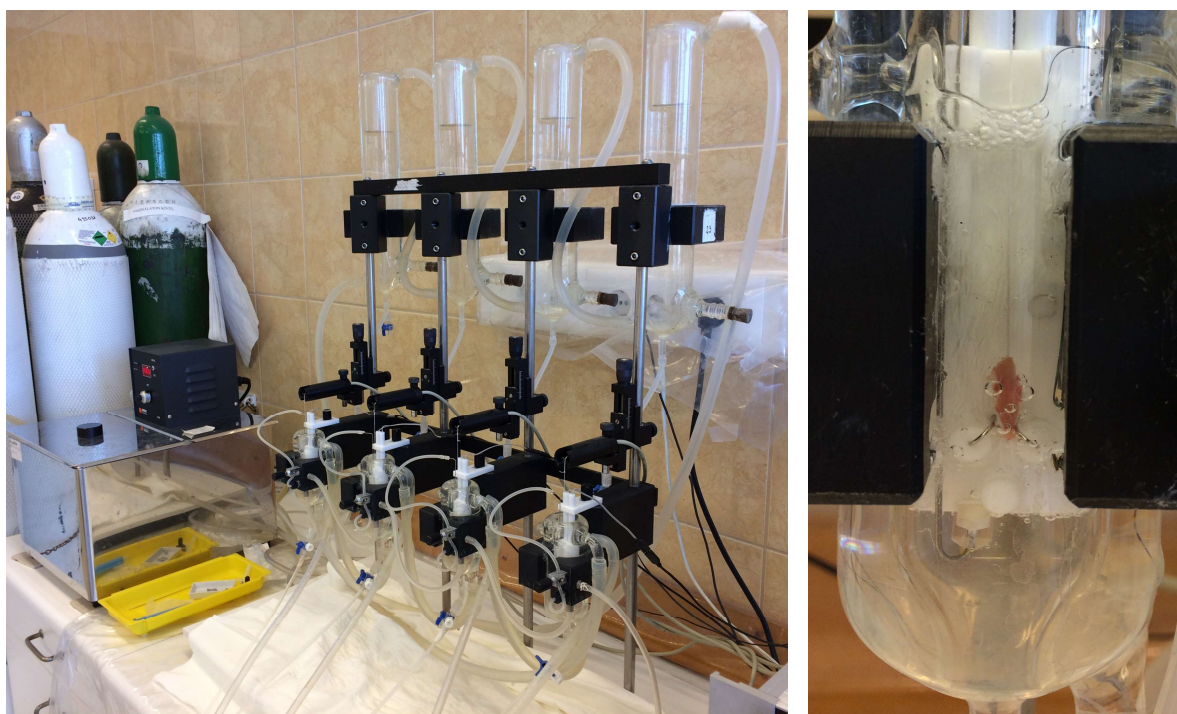
A kísérletekhez 600-800 g testtömegű, hím, Hartley típusú tengerimalacokat használtunk fel. Az állatok tartása és feldolgozása összhangban volt a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottságának Etikai Kódexével és a vonatkozó Európai Unió előírásokkal (25/2013/DEMÁB).

A tengerimalacokat guillotine segítségével dekapitáltuk, a szívet a nagyerek átvágásával eltávolítottuk, majd lemetszettük a bal pitvarok fülcséit. A pitvarfülcséket 10 ml-es, Krebs-oldatot tartalmazó, vertikális állású szervkádakban (TSZ-04, Experimetria, Budapest) függesztettük fel 10 mN nyugalmi feszülés (1 g-ot megtartó erő) mellett (5. ábra). A Krebs-oldatot folyamatosan karbogénnel (95% O₂ és 5% CO₂) szellőztettük (pH=7,4; 36 °C). A pitvarokat platinaelektróddal pontszerűen ingereltük programozható stimulátor (ST-02, Experimetria, Budapest) és erősítő (PST-02, Experimetria, Budapest) segítségével, körülbelül a küszöbfeszültség másfél-kétszeresével (kb. 1 V, 3 Hz, 1 ms impulzusszélesség). A kontrakciós erőt az izometriás összehúzódások amplitúdója jellemezte, amit transzducerrel (SD-01, Experimetria, Budapest) és jelerősítővel (SG-01D, Experimetria, Budapest) mértünk, továbbá hőírókaros poligráffal (R-61 6CH, Medicor, Budapest) rögzítettünk hőérzékeny papírra (6. ábra).

3.2.3. Kísérleti protokollok és csoportok

A pitvari preparátumokat random hat csoportba osztottuk a végrehajtandó hat kísérleti protokollnak megfelelően: Intakt CPA csoport, Torzult CPA csoport, Intakt NECA csoport, Torzult NECA csoport, Intakt CHA csoport, Torzult CHA csoport (n = 5-7).

A szervkádakban felfüggesztett, működő pitvarokat (5. ábra) először 40 percen át inkubáltuk Krebs-oldatban, amit először 5, majd 10 percenként cseréltünk rajtuk („mosás”). Ezután kumulatív E/c görbét vettünk fel rajtuk adenozinnaal (0.1 μM – 1 mM), amit 15 perc mosás követett (három oldatcserével). Ezt követően az Intakt jelzésű csoportokban kumulatív CPA, NECA vagy CHA E/c görbét vettünk fel (0.1 nM – 100 μM) annak megfelelően, hogy milyen agonista szerepelt a csoport nevében, amelybe az adott preparátum tartozott. Eközben a Torzult jelzésű csoportokban levő pitvarokhoz egyetlen dózisban CPA-t (100 nM), NECA-t (100 nM) vagy CHA-t (300 nM) mértünk (a csoport nevével összhangban), mint torzító koncentrációt (c_{bias}). Miután ennek hatása kialakult, ugyanazzal az agonistával kumulatív E/c görbét vettünk fel a pitvarokon (0.1 nM – 100 μM).



5. ábra. Négy szervkádás, izolált, túlélő szervi rendszer termosztátos vízkeringetővel és karbogénes palackokkal (balra), valamint egy Krebs-oldattal feltöltött szervkád a bele merülő (fehér) teflon szervtartóval, habköves szellőztetővel és a cérnával rögzített (piros) pitvarfülcsével (jobbra).

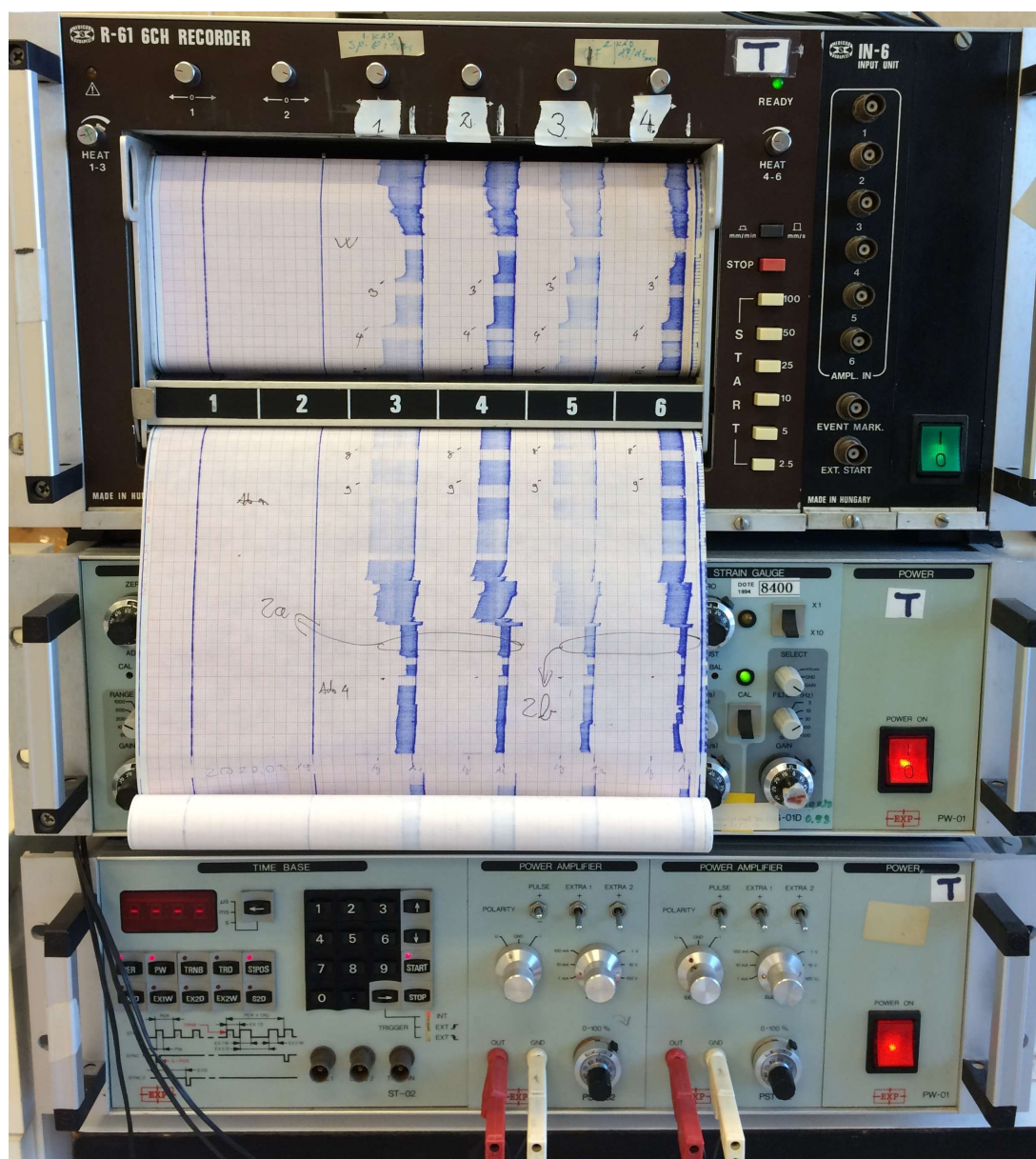
3.2.4. Az *ex vivo* koncentráció-hatás görbék kiértékelése

A hőérzékeny papíron sűrűn regisztrált mechanikai tevékenység alsó és felső burkológörbéjének távolságát (pontosabban a burkológörbék azonos időponthoz tartozó pontjainak távolságát) vettük a kontrakciós erő nagyságának. A E/c görbe felvétele során

beadott minden agonista koncentrációhoz megkerestük a jelenlétében kialakult legkisebb kontrakciós erőt és ezt használtuk fel a hatás kiszámolásához. A hatást úgy definiáltuk, mint a pitvarok kiindulási kontrakciós erejének százalékos csökkenését:

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

ahol: E: a hatás; F_0 : a E/c görbe kiindulási kontrakciós ereje (közvetlenül az első agonista dózis beadása előtt); F: az aktuális kontrakciós erő (a megelőzően beadott agonista koncentráció jelenlétében kialakult legkisebb kontrakciós erő).



6. ábra. Hőírókaros poligráf és a belőle kilógó hőérzékeny papír (rajta négy pitvar regisztrált mechanikai aktivitása), jelerősítő, stimulátor erősítővel (felülről lefelé)

3.2.5. Az *ex vivo* koncentráció-hatás görbék jellemzése

A E/c görbék adataira először a Hill modellt (3. egyenlet) illesztettük a legmegfelelőbb formában (14. egyenlet). Az individuális E/c görbék esetében ez a statisztikai elemzéshez szolgáltatott adatokat, a csoportonként átlagolt E/c görbék esetén pedig a torzító koncentráció (c_{bias}) meghatározását segítette (ld. később), illetve a E/c görbék ábrázolását tette szemléletesebbé. Az átlagolást a statisztikai számításokra és ábrakészítésre használt szoftver végezte oly módon, hogy a E/c adatokat csoportosítva vittük be (Prism 8 Curve Fitting Guide, 2019). Ezzel nem veszítettük el az egyedi adatokban rejlő információkat sem az átlagolt görbék, sem a rájuk való illesztés vonatkozásában.

3.2.6. A torzító koncentráció meghatározása

A csoportonként átlagolt CPA, NECA és CHA E/c görbékre az RRM modelljét is illesztettük (11. egyenlet). Mivel a Torzult jelzésű csoportokban levő pitvarokhoz ugyanannak az agonistának egy dózist mértek (c_{bias}), mint amivel azután a E/c görbét felvettük rajtuk, a 11. egyenlet c_x paramétere közvetlenül a c_{bias} -t becsülte. Az illesztés két különböző módon, individuálisan és globálisan történt. Individuális regresszió során a 11. egyenlet tartalmazta az azonos agonistával felvett Intakt jelzésű csoportok Hill paramétereit (E_{max} , EC_{50} és n), melyeket a 14. egyenlet illesztése szolgáltatott. Ez azt jelentette, hogy az átlagolt (mind Intakt, mind Torzult) CPA, NECA és CHA E/c görbék illesztésekor a 11. egyenletet „individualizálni” kellett a megfelelő empirikus paraméterek értékeinek beírásával. Globális regresszió során viszont a 11. egyenletet egyidejűleg illesztettük az összetartozó (azonos agonistával felvett) Intakt-Torzult átlagolt E/c görbe-párokra úgy, hogy megosztottuk (közösé tettük) az empirikus paramétereiket (E_{max} , EC_{50} és n).

A jelen vizsgálatban az individuális regresszió során a Torzult E/c görbékre történő illesztés célja a kísérleti elrendezés miatt ismert c_{bias} meghatározása volt. Az Intakt E/c görbékre való individuális illesztés a módszer olyan öntesztje (az Intakt görbék c_{bias} értéke *per definitionem* nulla), ami akkor is rendelkezésre áll, amikor a Torzult görbék c_{bias} -e ismeretlen. A globális regresszió egy lépésben szolgáltatta a Torzult és az Intakt E/c görbék c_{bias} értékeit. A különböző módokon (individuális és globális regresszió) és illesztési beállításokkal (ld. lentebb) meghatározott c_x értékek összehasonlítása lehetőséget adott az RRM kivitelezésének optimalizálására.

3.2.7. Görbeillesztési beállítások

A 11. egyenletet a következő illesztési beállítások mellett használtuk: hagyományos illetve robusztus regresszió, továbbá a súlyozás hiánya, súlyozás $1/Y^2$ -tel illetve súlyozás $1/SD^2$ -tel. A különböző regressziós módokat (individuális illetve globális) és illesztési beállításokat minden, a kivitelező szoftver által megengedett formában kombináltuk (3. táblázat).

Az azonos csoportban a E/c görbe azonos koncentrációjához tartozó Y értékeket (Y replikátumok) egyedi pontoknak („individual points”) tekintettük, ahogy a szoftver leírása ajánlotta, kivéve az $1/SD^2$ -tel való súlyozást, ahol az Y replikátumok átlaga volt az egyetlen opció. Minden más beállítás esetében az alapértelmezett opciót alkalmaztuk (Prism 8 Curve Fitting Guide, 2019).

	Hagyományos illesztés	Robusztus illesztés
Nincs súlyozás	Individuális Globális	Individuális Globális
Súlyozás $1/Y^2$ -tel	Individuális Globális	
Súlyozás $1/SD^2$ -tel	Individuális Globális	

3. táblázat. A regresszió két módjának kombinálása két olyan beállítási lehetőséggel, melyek az Y (hatás) adatok eloszlását veszik figyelembe, és három másik beállítási lehetőséggel, melyek az Y adatok homo- illetve heteroszkedaszticitásának figyelembevételéért felelősek. A kombináció tükrözi a görbeillesztésre használt szoftver tulajdonságait is, pl. a súlyozás lehetetlenségét robusztus regresszió során (Prism 8 Curve Fitting Guide, 2019).

3.3. Adatfeldolgozás

Minden pitvari preparátum három kritériumot kellett teljesítsen a statisztikai elemzésbe való bekerüléshez:

1. a nyugalmi kontrakciós erőnek el kellett érnie az 1 mN-t az adenosin E/c görbe felvétele előtt;

2. az összehúzódásoknak szabályosaknak (az ingerlés frekvenciáját követőnek) kellett lenniük;

3. a 10 μ M adenzinra adott válasznak belül kellett lennie a számtani közép $\pm$ 2 SD intervallumon. A számtani közép $\pm$ 2 SD az első két kritériumot teljesítő pitvarok felhasználásával került meghatározásra.

Az adatok eloszlásának normális voltát Shapiro-Wilk teszttel ellenőriztük. Kettőnél több adatcsoportot egyszempontú ANOVA-val és az azt követő Tukey poszt-teszttel hasonlítottunk össze.

A görbeillesztéshez használt egyenletekben a koncentrációkat (c , EC_{50} , c_x) 10-es alapú logaritmusként fejeztük ki az ajánlásoknak megfelelően (Motulsky és Christopoulos, 2004; Prism 8 Curve Fitting Guide, 2019). A statisztikai elemzés, a görbeillesztés és az ábrák készítése az *in silico* vizsgálatban 8.1.1 verziójú, az *ex vivo* vizsgálat során pedig 8.2.1 verziójú GraphPad Prism szoftverrel történt (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Egyéb számításokhoz Microsoft Excel 2016 szoftvert használtunk (Microsoft Co., Redmond, WA, USA).

4. Eredmények

4.1. *In silico* eredmények

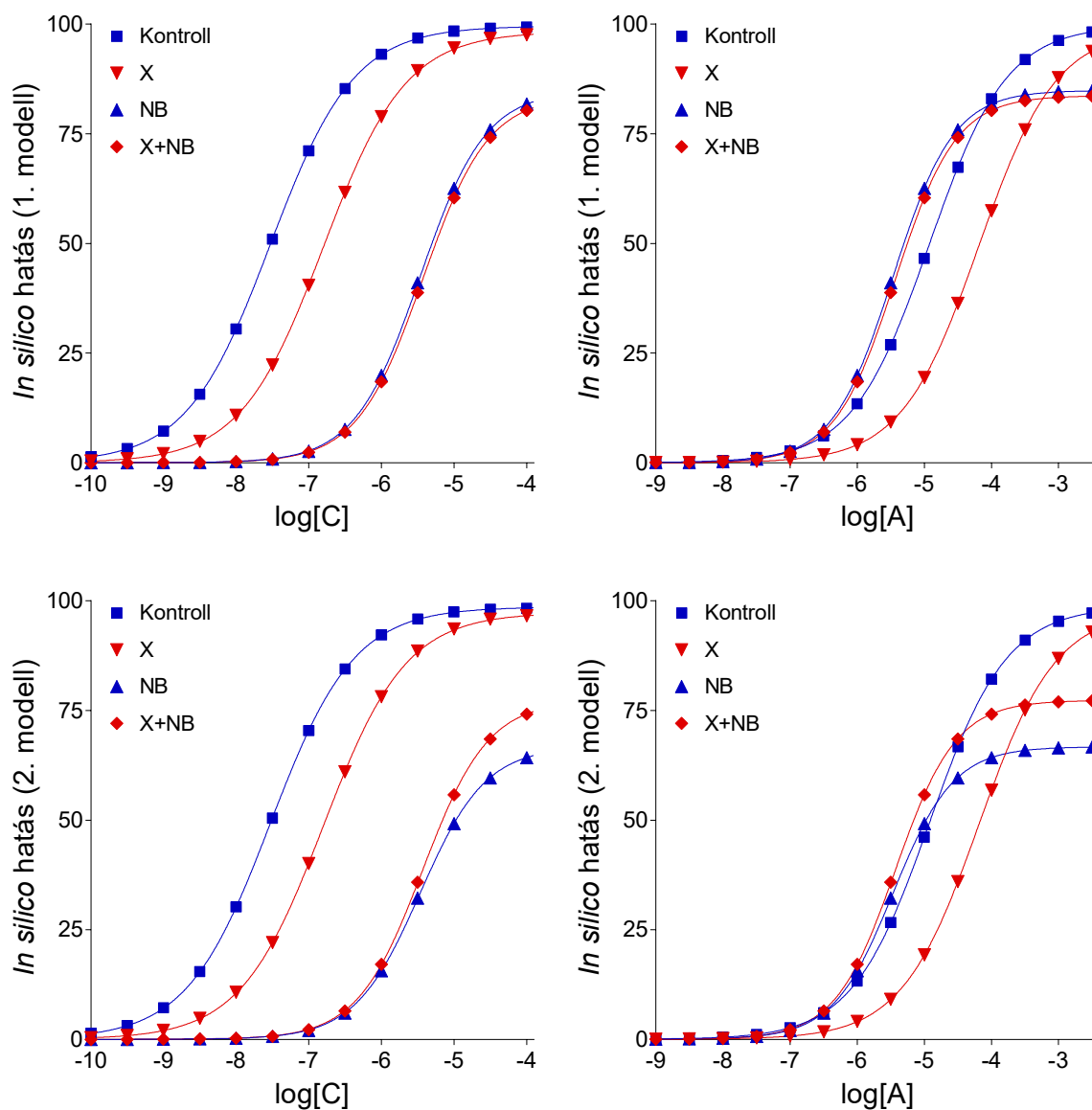
4.1.1. Az 1. és 2. modell

Az 1. illetve 2. modell (melyek csak az E_m paraméter 100-as illetve 99-es értékében különböztek) tartalmazták a legkevesebb feltételezést a tengerimalac bal pitvari myocardium adenosin homeosztázisát és A_1 adenosinerg rendszerének az inotrópia szabályozásában résztvevő részét illető modell tekintetében. Feltételezték az adenosint reprezentáló A agonista transzportjának komplett blokádját az NBTI-t szimbolizáló NB vegyület által, továbbá az NB vegyület és az FSCPX-et reprezentáló X vegyület közötti interakció hiányát. Az egyszerű *in silico* E/c görbék (vagyis amelyek nem kaptak kezelést az NB vegyülettel, így nem viselik magukon a c_{bias} hatását) jól utánozzák a nekik megfelelő *ex vivo* E/c görbéket (vö. 1. és 7. ábra). Ezzel szemben az összetett *in silico* E/c görbéket (melyek NB vegyület kezelést kaptak, ezért torzultak) nem lehetett a nekik megfelelő *ex vivo* E/c görbék pozíciójába hozni, különös tekintettel az X+NB-kezelt E/c görbék alakjára (vö. 1. és 7. ábra). Ily módon az 1. és a 2. modell nem volt képes megfelelően szimulálni az eredeti biológiai rendszert (ld. 4. ábra, 1. táblázat).

A két korai modell legfontosabb tanulsága, hogy az operatív modell E_m paramétere (ami a rendszer maximális jelerősítő képességét jellemzi) igen jelentős hatással bír a jelen vizsgálat összetett E/c görbéinek lefutására. Amennyiben $E_m = 100$ (pontosabban, ha E_m a 100 - ~99.9 intervallumon belül van), mindkét csak NB-kezelt E/c görbe a neki megfelelő (azonos agonistával felvett) X+NB-kezelt E/c görbe fölött futott. Ha azonban az E_m ennél kisebb, az X+NB-kezelt E/c görbék a nekik megfelelő csak NB-kezelt E/c görbék fölé kerültek (7. ábra).

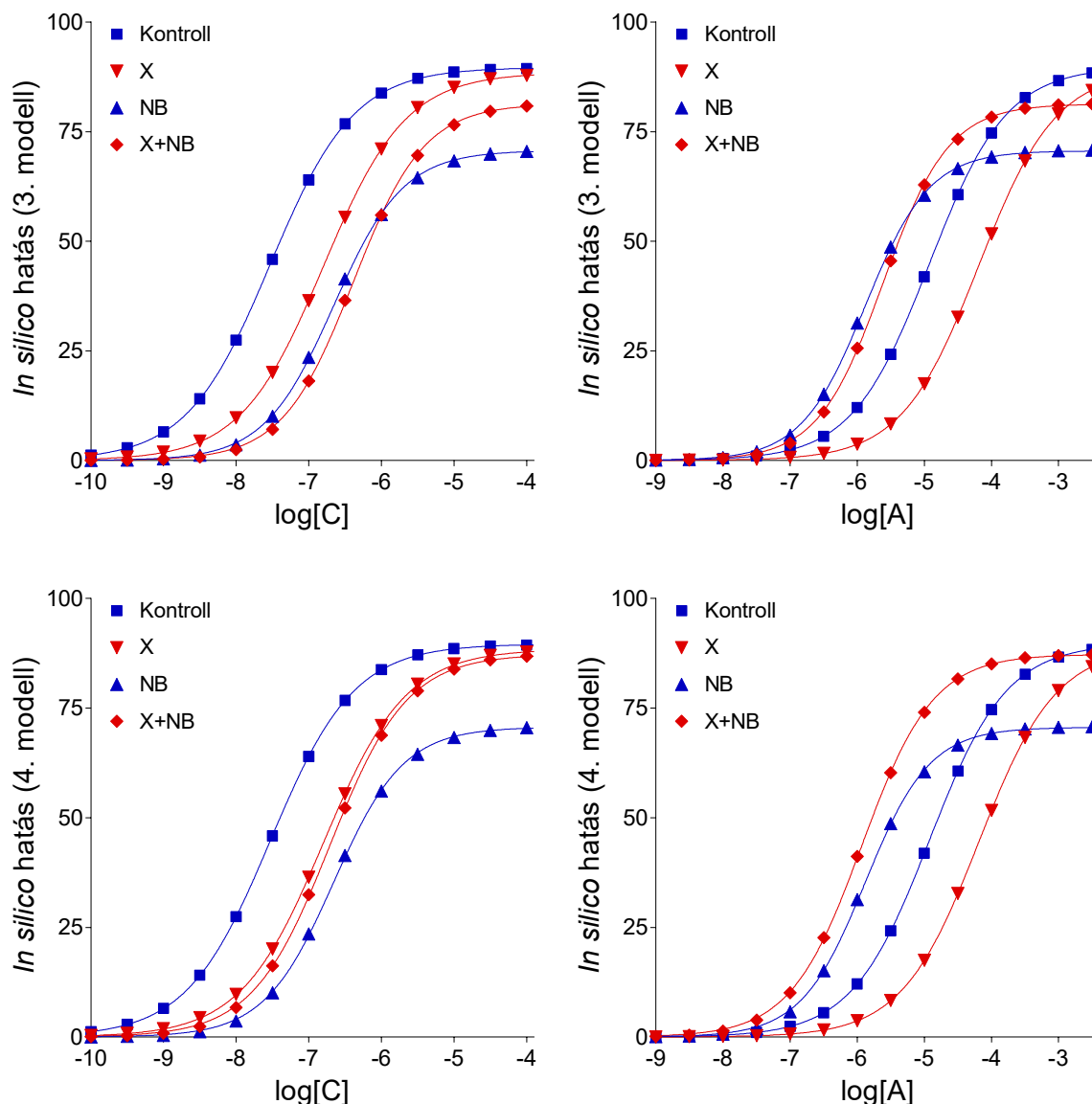
Az E_m 99.9 körüli értékénél az összetartozó (azonos agonistával felvett) összetett E/c görbék gyakorlatilag egybeesnek. Ez a jelenség jelöli ki azon E_m intervallum alsó határát, amelyen belül maradva az FSCPX-nek a munkacsoport korábbi *ex vivo* vizsgálataiban tapasztalt paradox viselkedése (vagyis az, hogy az FSCPX látszólag növeli az adenosinra adott választ) nem állítható elő *in silico* (az 1. modell keretein belül). Fontos leszögezni, hogy az E_m 100 fölötti értékének nincs értelme az általunk szimulált *ex vivo* rendszerben (maga a

hatás sem lehet nagyobb 100%-nál). Ennek megfelelően az E_m 100 fölé emelése először értelmetlenül nagygyá (100% fölöttivé), majd negatívvá teszi az összetett E/c görbék E_{max} -át.



7. ábra. A CPA-t és adenosint reprezentáló C illetve A agonista szimulált koncentrációhatás (E/c) görbéi az 1. (felül) és a 2. (alul) modell szerint. Az 1. illetve a 2. modell közötti egyetlen különbség az E_m paraméter (ld. 6-8. egyenlet) értéke (100 illetve 99). A E/c görbék az NBTI-t szimuláló NB vegyület hatását mutatják a C és A agonista által kiváltott válaszokra az FSCPX-et reprezentáló X vegyülettel való előkezelés hiányában (kék görbék) illetve megléte esetén (piros görbék). Az x tengely az agonista szervkádbeli koncentrációjának (mól/l) 10-es alapú logaritmusát tünteti fel, míg az y tengely a hatást. A vonalak az illesztett Hill egyenletet (14. egyenlet) mutatják. CPA: N^6 -cyclopentyladenosine; NBTI: S-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine; FSCPX: 8-cyclopentyl- N^3 -[3-(4-(fluorosulfonyl)benzoyloxy)propyl]- N^1 -propylxanthine.

4.1.2. A 3. modell



8. ábra. A CPA-t illetve adenzint reprezentáló C illetve A agonista szimulált koncentráció-hatás (E/c) görbéi az 3. (felül) és a 4. (alul) modell szerint. A E/c görbék az NBTI-t szimuláló NB vegyület hatását mutatják a C és A agonista által kiváltott válaszokra az FSCPX-et reprezentáló X vegyülettel való előkezelés hiányában (kék görbék) illetve megléte esetén (piros görbék). Az x tengely az adott agonista szervkádbeli koncentrációjának (mól/l) 10-es alapú logaritmusát tünteti fel, míg az y tengely a hatást. A vonalak az illesztett Hill egyenletet (14. egyenlet) mutatják. CPA: N⁶-cyclopentyladenosine; NBTI: S-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine; FSCPX: 8-cyclopentyl-N³-[3-(4-(fluorosulfonyl)benzoyloxy)propyl]-N¹-propylxanthine.

A 3. modell három tulajdonságában különbözik elődeitől: 1. $E_m = 90$; 2. a c_{bias} az eredeti *ex vivo* rendszerben (Erdei és mtsai, 2018) a csak NBTI-kezelt CPA E/c görbék

esetében mért c_x értékét kapta; 3. az NB vegyület jelenlétében is megengedtünk egy kisfokú A agonista transzportot. A 3. modell elfogadhatóan szimulálta az egyszerű E/c görbéket és a csak NB-kezelt E/c görbéket, azonban az X+NB-kezelt E/c görbék lefutását nem engedte a nekik megfelelő *ex vivo* E/c görbék közelébe vinni (vö. 1. és 8. ábra). Nem maradt más hátra, interakciót kell feltételeznünk az X és NB vegyület hatásai között.

4.1.3. A 4. modell

A 4. modell abban különbözött a 3. modelltől, hogy interakciót tételezett fel az X és az NB vegyület hatásai között oly módon, hogy az endogén A agonista hatását két c_{bias} értékkel vette figyelembe, külön a csak NB kezelésre és az X+NB kezelésre. A két c_{bias} a modellezendő *ex vivo* rendszert biztosító vizsgálatban mért két c_x volt (Erdei és mtsai, 2018). Az, hogy az X+NB kezeléshez tartozó c_{bias} kisebb volt, mint a csak NB kezelésre jellemző, azt fejezte ki, hogy az X vegyület gátolta az NB vegyületet az endogén A agonista koncentrációjának növelésében. Mivel más módon nem vettük figyelembe az X és NB vegyület alkalmazását ugyanazokon a pitvarokon, ez azt is jelentette, hogy a 4. modellben az X vegyület nem befolyásolta az NB vegyület hatását az exogén A agonistára. Az előző modellekkel szemben a 4. modellben mind az egyszerű, mind az összetett E/c görbék lefutása jól szimulálta a nekik megfelelő *ex vivo* görbéket (vö. 1. és 8. ábra, 1. és 4. táblázat). Fontos továbbá, hogy a végleges 4. modellben a paraméterek értékének kismértékű változtatásai már nem okoztak lényeges változást a szimulált E/c görbék helyzetében és alakjában.

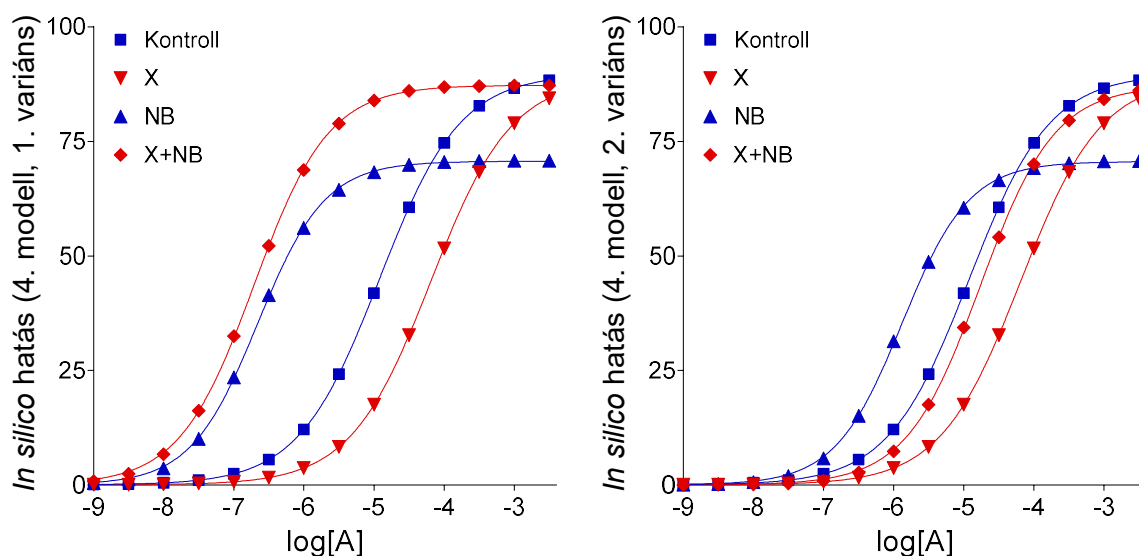
C agonista	Kontroll	X	NB	X+NB
E_{max}	89.61 ± 0.03	88.45 ± 0.07	70.67 ± 0.12	87.27 ± 0.12
$\log EC_{50}$	-7.53 ± 0.001	-6.8 ± 0.003	-6.66 ± 0.005	-6.71 ± 0.005
n	0.75 ± 0.001	0.76 ± 0.003	0.91 ± 0.008	0.82 ± 0.006
A agonista	Kontroll	X	NB	X+NB
E_{max}	89.76 ± 0.01	89 ± 0.04	70.61 ± 0.14	87.27 ± 0.15
$\log EC_{50}$	-4.92 ± 0.0003	-4.19 ± 0.0008	-5.88 ± 0.005	-5.93 ± 0.005
n	0.75 ± 0.0004	0.75 ± 0.0007	0.91 ± 0.009	0.82 ± 0.006

4. táblázat. A 4. modell koncentráció-hatás (E/c) görbéinek (ld. 8. ábra) Hill paraméterei. Az E_{max} , $\log EC_{50}$ és n (számtani közép $\pm$ standard error) a szimulált E/c görbékre illesztett Hill egyenlet (14. egyenlet) regressziós paraméterei. A standard error itt azt jellemzi, milyen precíz a regressziós paraméterek értékeinek meghatározása.

4.1.4. A 4. modell 1. és 2. variánsa

A 4. modell variánsai az anyamodelltól az A agonista összetett E/c görbéiben (1. variáns) illetve az A agonista X+NB-kezelt E/c görbéjében (2. variáns) különböztek.

Az 1. variáns abban tért el a 4. modelltől, hogy ismét feltételezte az A agonista transzportjának az NB vegyület általi komplett blokádját. Ennek eredményeképpen az A agonista összetett (NB-nek kitett) E/c görbéi kevésbé követték le a nekik megfelelő *ex vivo* E/c görbéket, mint a 4. modell alapváltozata (a paraméterek értékeinek finomhangolási kísérletei ellenére, vö. 1., 8. és 9. ábra). Ez alapján érdemes feltételezni, hogy az NB vegyület nem állítja le teljesen az A agonista befelé irányuló transzportját (ahogy azt a 4. modell is megjeleníti).



9. ábra. Az adenzint megjelenítő A agonista szimulált koncentráció-hatás (E/c) görbéi a 4. modell 1. és 2. variánsa szerint. A E/c görbék az NBTI-t szimuláló NB vegyület hatását mutatják az A agonista által kiváltott válaszra az FSCPX-et reprezentáló X vegyülettel való előkezelés hiányában (kék görbék) illetve megléte esetén (piros görbék). Az x tengely az A agonista szervkádbeli koncentrációjának (mól/l) 10-es alapú logaritmusát tünteti fel, míg az y tengely a hatást. A vonalak az illesztett Hill egyenletet (14. egyenlet) mutatják. NBTI: S-(2-hidroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine; FSCPX: 8-cyclopentyl-N³-[3-(4-(fluorosulfonyl)benzoyloxy)propyl]-N¹-propylxanthine.

A 2. variáns abban különbözött az alapmodelltől, hogy feltételezte, hogy az X vegyülettel végzett előkezelés az NB vegyület mindkét hatását gátolja, vagyis az exogén A agonista koncentrációjának növelését éppúgy, mint az endogénét. Ennek megfelelően a 2.

variánsra nemcsak két c_{bias} használata volt jellemző, hanem az A agonista transzportjának gyengébb NB általi gátlása is (X+NB-kezelt állapotban a csak NB-kezelt állapothoz képest az A agonista E/c görbéi esetében). Ennek következtében az A agonista X+NB-kezelt E/c görbéje diszlokálódott mind az alapmodell (8. ábra), mind az *ex vivo* rendszer (4. ábra) neki megfelelő görbéjéhez képest. Ezzel összhangban minél kisebbnek vettük az X előkezelés hatását az exogén A agonista szintjére NB jelenlétében, annál jobban utánozta az A agonista X+NB-kezelt E/c görbéje az adenzin FSCPX+NBTI-kezelt E/c görbéjének lefutását. Az eredeti 4. modell tehát jobban megközelíti az *ex vivo* rendszert, mint a 2. variáns.

Mindent egybevetve, a 4. modell (8. ábra, 4. táblázat) bizonyult a legjobbnak az *ex vivo* rendszer (4. ábra, 1. táblázat) leírására, ezt tekinthetjük tehát *in silico* vizsgálatunk végső modelljének.

Az értekezést megalapozó *in silico* vizsgálat során a jelölt (az értekezés írójának) hozzájárulása a közös munka során született eredményekhez jelentős (mintegy 60%) volt.

4.2. *Ex vivo* eredmények

4.2.1. Az adenzinra adott válasz

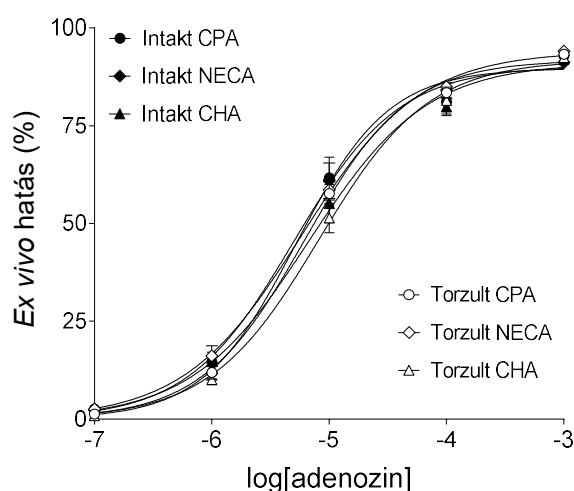
Az adenzin koncentráció-függően csökkentette az ingerelt bal pitvarok kontrakciós erejét minden csoportban (10. ábra). (Fontos megemlíteni, hogy a vizsgálat ezen szakaszában az egyes protokollok még egységesek voltak.) Az adenzin E/c görbék csoportonként átlagolt Hill paraméterei nem különböztek szignifikánsan egymástól. Ezek az eredmények az *ex vivo* kísérletekhez felhasznált pitvarok sikeres random elosztását mutatják az egyes csoportok között.

4.2.2. A szintetikus A₁ adenzin receptor agonistákra adott válasz

Az „Intakt” jelzésű csoportokban a CPA, a NECA és a CHA szintén csökkentette a pitvari kontrakciós erőt koncentráció-függő módon (11. ábra, A panel). Az egyes szintetikus agonisták E/c görbéi szignifikánsan különböztek logEC₅₀ értékükben, míg E_{max} és n értékeik hasonlóak voltak (5. táblázat). Összhangban azzal, hogy a CPA, a NECA és a CHA rosszabb szubsztrátjai az adenzint átalakító enzimeknek és transzportereknek, mint az adenzin

(Pavan és IJzerman, 1998; Fredholm és mtsai, 2001), a szintetikus agonisták EC_{50} értékei lényegesen (mintegy két-három nagyságrenddel) kisebbek voltak, mint az adenzin EC_{50} -e, miközben az E_{max} paraméter hasonló értékeket vett fel mind a négy agonista esetében (vö. 10. és 11. ábra, A panel).

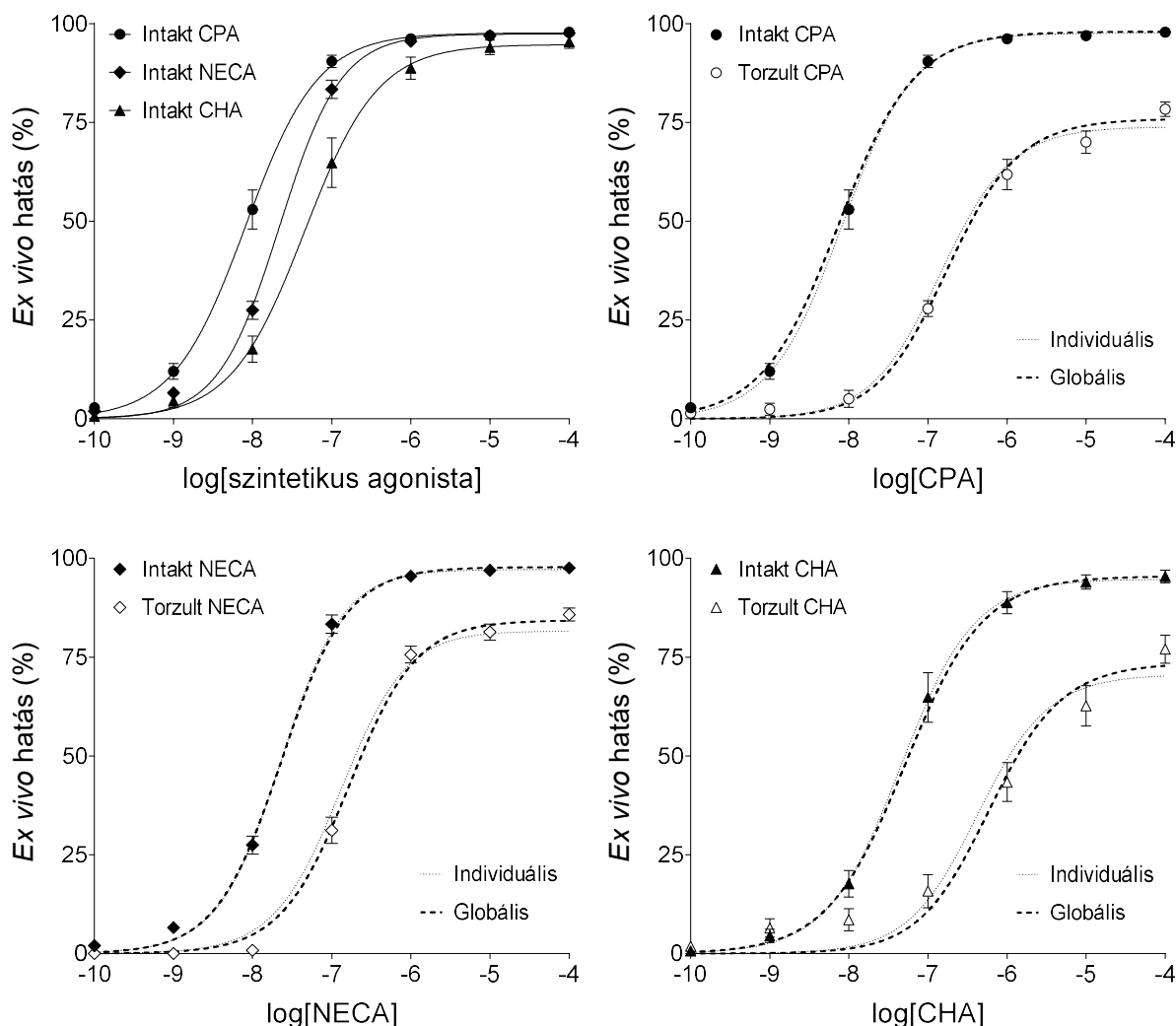
A várakozásnak megfelelően a „Torzult” csoportokban a CPA (100 nM), NECA (100 nM) illetve CHA (300 nM) egyszeri extra dózisa (ami megközelítően egy nagyságrenddel volt nagyobb, mint a kérdéses agonista EC_{50} értéke) jelentősen depressimálta és jobbra tolta a E/c görbét ugyanazon agonista „Intakt” E/c görbéjéhez képest (11. ábra, B, C és D panel).



10. ábra. Az izolált tengerimalac bal pitvarok adenzinra adott direkt negatív inotróp válasza a hat kísérleti csoportban. Az x tengely a koncentráció-hatás görbék felvétele során beadott adenzin koncentrációjának (mól/l) 10-es alapú logaritmusát mutatja, míg az y tengely a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenését, mint hatást. Az „Intakt” (üres szimbólumok) és „Torzult” (kitöltött szimbólumok) kifejezések a csoportok neveiben a későbbi (és nem a jelenlegi) állapotra utalnak. A szimbólumok az adenzinra adott válaszok csoportátlagát ($\pm$ SEM) jelzik. A görbék a csoportátlagokra illesztett Hill modellt (14. egyenlet) mutatják. CPA: N⁶-cyclopentyladenosine; NECA: 5'-(N-ethylcarboxamido)adenosine; CHA: N⁶-cyclohexyladenosine.

4.2.3. Illesztés a szintetikus A₁ adenzin receptor agonisták torzult koncentráció-hatás görbéire

A regresszió eredményeit két indikátorral jellemeztük: egyrészt a $\log c_x$ regressziós paraméter numerusának (c_x) távolságával a megfelelő c_{bias} -tól (accuracy), másrészt, ahol lehetőség nyílt rá, a $\log c_x$ 95%-os konfidencia intervallumának szélességével (precision).



11. ábra. Az izolált tengerimalac bal pitvarok direkt negatív inotróp válasza három szintetikus A_1 adenosin receptor agonistára a hat kísérleti csoportban. Az x tengely a szintetikus agonisták koncentrációjának (mól/l) 10-es alapú logaritmusát mutatja, míg az y tengely a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenését, mint hatást. Az „Intakt” csoportokba tartozó pitvarokon (üres szimbólumok) hagyományos koncentráció-hatás (E/c) görbék felvételére került sor, míg a „Torzult” csoportokba sorolt pitvarok (kitöltött szimbólumok) a E/c görbe felvétele előtt kaptak egy extra dózist abból az agonistából, amellyel később a E/c görbe fel lett véve. Az „Intakt” csoportokat együtt az A panel mutatja, a B, C és D panelen pedig külön az egyes szintetikus agonisták két-két csoportja. A szimbólumok a szintetikus agonistákra adott válaszok csoportátlagát ($\pm$ SEM) jelzik. A folyamatos vonalak a csoportátlagokra illesztett Hill modellt (14. egyenlet) jelenítik meg. A vékony szaggatott vonalak a csoportátlagokra individuálisan illesztett RRM modellt (11. egyenlet) mutatják, míg a vastag szaggatott vonalak ugyanezt globális illesztés mellett. A 11. egyenlet egyéb beállításai mindkét esetben robusztus regresszió és a súlyozás mellőzése voltak (mivel általánosságban ezek adták a legpontosabb becsléseket). CPA: N^6 -cyclopentyladenosine; NECA: 5'-(N-ethylcarboxamido)adenosine; CHA: N^6 -cyclohexyladenosine.

	Intakt CPA (<i>n</i> = 6)	Intakt NECA (<i>n</i> = 7)	Intakt CHA (<i>n</i> = 6)
$E_{\max}$ (%)	97.4 ± 0.8	97.5 ± 0.5 ns	94.8 ± 1.7 ns, ns
$\log EC_{50}$	-8.1 ± 0.09	-7.66 ± 0.05 **	-7.33 ± 0.11 ###, +
<i>n</i>	1.02 ± 0.05	1.14 ± 0.07 ns	0.98 ± 0.03 ns, ns

5. táblázat. Az „Intakt” csoportok szintetikus agonistával felvett koncentráció-hatás (E/c) görbéinek (ld. 11. ábra, A panel) Hill paraméterei (számítási közép $\pm$ SEM). Minden szignifikáns különbséget feltüntettünk (*: CPA – NECA; #: CPA – CHA; +: NECA – CHA összehasonlítás). A szimbólumok száma a statisztikai szignifikancia szintjét mutatja (1 db: $p < 0.05$; 2 db: $p < 0.01$; 3 db: $p < 0.001$). CPA: N⁶-cyclopentyladenosine; NECA: 5'-(N-ethylcarboxamido)adenosine; CHA: N⁶-cyclohexyladenosine; ns: nem szignifikáns.

A c_x értékek minden olyan esetben elfogadható becslést adtak a torzító koncentrációra (c_{bias}), amikor az RRM-et súlyozás nélkül kiviteleztek. Ezzel szemben az $1/SD^2$ -tel, de különösen az $1/Y^2$ -tel végzett súlyozás drámaian rontotta a becslés pontosságát, sőt néhány esetben egyenesen lehetetlenné tette a görbeillesztést (6. táblázat). A súlyozás nélküli individuális illesztés hagyományos regresszió alkalmazása mellett szűk 95%-os konfidencia intervallumokat eredményezett. Ugyanez globális regresszió esetén azonban tág 95%-os konfidencia intervallumokhoz vezetett (6. táblázat).

Várakozásainkkal ellentétben vizsgálataink során a globális regresszió (a 11. egyenlet egyidejű illesztése az összetartozó átlagolt Intakt-Torzult E/c görbékre) nem javította az RRM alkalmazhatóságát. A globális illesztés, noha gyorsabb és kényelmesebb volt, pontatlanabb becslést eredményezett, mint a klasszikus individuális illesztés (6. táblázat). Ezzel összhangban a globális regresszió inkább növelte, mintsem csökkentette volna a görbeillesztés bizonytalanságát, ami szélesebb 95%-os konfidencia intervallumokban nyilvánult meg (6. táblázat).

A Lorentz eloszlást feltételező robusztus regresszió mérsékelten javította a becslés pontosságát a normális eloszlást feltételező hagyományos regresszióhoz képest, kivéve a globális és robusztus illesztést a Torzult CHA csoportban (6. táblázat). Az általunk használt görbeillesztő szoftverrel robusztus regresszió esetében nem lehetett súlyozást alkalmazni.

Individuális, hagyományos, $\emptyset$	Torzult CPA	Intakt CPA	Torzult NECA	Intakt NECA	Torzult CHA	Intakt CHA
$\log c_x$	-6.88	-19107	-6.87	-8.92	-6.45	-52574
95% CI	-6.93 – -6.83	széles	-6.92 – -6.83	? – -8.32	-6.55 – -6.36	széles
c_x (nM)	131.4	0	133.6	1.2	352.7	0
Individuális, robusztus, $\emptyset$	Torzult CPA	Intakt CPA	Torzult NECA	Intakt NECA	Torzult CHA	Intakt CHA
$\log c_x$	-6.9	-19107	-6.88	-8.64	-6.47	-5257
c_x (nM)	125.9	0	131.4	2.3	335.8	0
Globális, hagyományos, $\emptyset$	Torzult CPA	Intakt CPA	Torzult NECA	Intakt NECA	Torzult CHA	Intakt CHA
$\log c_x$	-6.84	-7201	-6.77	-35907	-6.39	-9892707770
95% CI	széles	széles	széles	széles	széles	széles
c_x (nM)	145.9	0	170	0	403.7	0
Globális, robusztus, $\emptyset$	Torzult CPA	Intakt CPA	Torzult NECA	Intakt NECA	Torzult CHA	Intakt CHA
$\log c_x$	-6.85	-7201	-6.82	-35907	-6.36	-9892707770
c_x (nM)	142.6	0	153.3	0	439	0
Individuális, hagyományos, 1/Y²	Torzult CPA	Intakt CPA	Torzult NECA	Intakt NECA	Torzult CHA	Intakt CHA
$\log c_x$	-8.21	-19107	-6.36	-8.51	-317820174071	-52574
95% CI	? – -8.163	széles	? – -6.34	-8.89 – -8.2	széles	széles
c_x (nM)	6.2	0	438.5	3.1	0	0
Globális, hagyományos, 1/Y²	Torzult CPA	Intakt CPA	Torzult NECA	Intakt NECA	Torzult CHA	Intakt CHA
$\log c_x$	-366.5	-7201	-6.146	-35907	-	-
95% CI	széles	széles	széles	széles	-	-
c_x (nM)	0	0	714.8	0	-	-
Individuális, hagyományos, 1/SD²	Torzult CPA	Intakt CPA	Torzult NECA	Intakt NECA	Torzult CHA	Intakt CHA
$\log c_x$	-6.9	-42781	-	-8.66	-6.5	-56039
95% CI	-6.99 – -6.82	széles	-	? – -7.96	-6.77 – -6.26	széles
c_x (nM)	125.7	0	-	2.2	318.6	0
Globális, hagyományos, 1/SD²	Torzult CPA	Intakt CPA	Torzult NECA	Intakt NECA	Torzult CHA	Intakt CHA
$\log c_x$	-6.87	-1353	-	-	-8.26	-22.51
95% CI	széles	széles	-	-	széles	széles
c_x (nM)	136.5	0	-	-	554.1	3.11·10⁻¹⁴

6. táblázat. A $\log c_x$ értékek és a hozzájuk tartozó 95%-os konfidencia intervallumok (95% CI), továbbá a c_x értékek a hat kísérleti csoportban. $\emptyset$: nem súlyozott; Y: Y (hatás) érték; SD: standard deviáció; CPA: N⁶-cyclopentyladenosine; NECA: 5'-(N-ethylcarboxamido)adenosine; CHA: N⁶-cyclohexyladenosine; - : az illesztés nem járt eredménnyel

Összefoglalva, a vizsgált görbeillesztési módok és beállítások közül az RRM pontosságára a legnagyobb hatást a súlyozás gyakorolta, míg a legkisebbet az adatok eloszlására vonatkozó feltételezés (Gauss- vagy Lorentz-féle). *Ex vivo* vizsgálatunk adatainak RRM-mel való elemzése szempontjából a legjobb eredményt a súlyozás mellőzése adta individuális illesztési mód alkalmazása mellett.

4.2.4. Illesztés a szintetikus A₁ adenzin receptor agonisták intakt koncentráció-hatás görbéire

Az Intakt csoportok E/c görbéin végzett regresszió egyfajta belső kontrollként szolgált a Torzult csoportokban végzett görbeillesztéshez. Individuális regresszió során az Intakt E/c görbék a Torzult párjaiktól függetlenül kerültek illesztésre, míg a globális regresszió az Intakt-Torzult E/c görbepárokhoz egy lépésben adta meg a c_x értékeket. Minden belső kontroll funkciójú c_x igen kis (0 vagy 0-hoz közeli) értéket mutatott a várakozásnak megfelelően (6. táblázat).

Mivel a 0-nak nincs logaritmus, az Intakt E/c görbékre illesztett 11. egyenlet nem tudta a legpontosabb értéket megadni, csak közelíteni azt az egyik irányból. Ez hozzájárulhatott ahhoz az illesztési bizonytalansághoz (széles 95%-os konfidencia intervallumok), ami a legtöbb Intakt görbe esetén megfigyelhető volt. Az ez alól kivételt jelentő Intakt E/c görbék viselkedése (pl. az individuális és hagyományos illesztés $1/Y^2$ -tel való súlyozás mellett az Intakt NECA csoportban) inkább tűnik véletlennek, mint szabályszerűnek (6. táblázat).

Az értekezést megalapozó *ex vivo* vizsgálat során a jelölt (az értekezés írójának) részvétele mind a kísérletek kivitelezésében (mintegy 50%), mind a kapott eredmények értelmezésében (mintegy 60%) meghatározó volt.

5. Megbeszélés

5.1. *In silico* következtetések

A szív különböző működései számos megközelítésből modellezhetőek, ideértve *in silico* (Hwang és mtsai, 2014; Ai és mtsai, 2019), *ex vivo* (Romano és Ceci, 2018) és *in vivo* lehetőségeket (García-Herrera és Celentano, 2013). A mi *in silico* munkánk a tengerimalac bal pitvari myocardium adenozin homeosztázisára és a kontraktilitás A_1 adenozinerg szabályozására fókuszált, hasonlóan a munkacsoport egy korábbi komputer szimulációs vizsgálatához (Zsuga és mtsai, 2017). *In silico* reprodukáltuk a legutóbbi *ex vivo* munkánk (Erdei és mtsai, 2018) nyolc, CPA-val illetve adenozinnal felvett E/c görbáját. Eközben négy szimulációs modellt (és az utolsóhoz két további variánst) dolgoztunk ki, melyek mindegyike feltételezések egy komplett rendszerét tartalmazta. A cél annak a modellnek a kifejlesztése volt, amelyik a legjobban utánozza a korábbi *ex vivo* eredményeket (ld. 4. ábra, 1. táblázat).

In silico vizsgálatunk 1. és 2. modellje alapján levont következtetéseink fényében pontosítanunk kell a korábbi *in silico* vizsgálat (Zsuga és mtsai, 2017) néhány megállapítását. Munkacsoportunk számos korábbi vizsgálata során tapasztalta az FSCPX+NBTI-kezelt adenozin E/c görbék paradox lefutását a csak NBTI-vel kezelt adenozin E/c görbékhez képest, nevezetesen azt, hogy NBTI jelenlétében az irreverzibilis A_1 receptor antagonista FSCPX látszólag növelte az adenozin E/c görbe maximális válaszát (E_{max}) (Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014; Erdei és mtsai, 2018). A munkacsoport korábbi *in silico* vizsgálatában (Zsuga és mtsai, 2017) ezt a paradox jelenséget sikerült reprodukálni azt feltételezve, hogy az FSCPX előkezelés csökkenti az NBTI hatását mind az endogén, mind az exogén adenozinra. Amikor ezt a korábbi eredményt igyekeztek biológiai kontextusba helyezni, elképzelhetőnek tűnt, hogy az FSCPX úgy módosítja az ENT1-et, hogy az továbbra is átengedi az adenozint, de kevésbé lesz gátlható NBTI-vel. Az új *in silico* modellezés során azonban ez a paradox viselkedés úgy is előhívható volt, hogy a maximum helyett egy valamivel kisebb értékre állítottuk be az operatív modell E_m paraméterét (mint ahogy azt az 1. és 2. modell összehasonlítása mutatja a 7. ábrán). Ebből következően tehát az FSCPX+NBTI-kezelt adenozin E/c görbék paradox lefutása a tisztán NBTI-vel kezelt adenozin E/c görbékhez képest csak utalhat egy FSCPX és NBTI közötti interakcióra, de nem bizonyítja azt. Mindazonáltal a korábbi *in silico* munka (Zsuga és mtsai, 2017) azon

következtetése, hogy a probléma tisztázásához feltétlenül szükség van egy *ex vivo* FSCPX+NBTI-kezelt CPA E/c görbére (vagyis újabb biológiai adatokra), hasznosnak és előre vivőnek bizonyult. Az ezt követő *ex vivo* vizsgálat (Erdei és mtsai, 2018) ilyen irányban kiegészített protokolljának köszönhetően bebizonyosodott, hogy az FSCPX figyelemre méltó mértékben csökkenti az endogén adenzin NBTI általi interstitialis akkumulációját, ami *ex vivo* bizonyítékként szolgál az FSCPX és az NBTI interakciójára (a hatásaik szintjén).

Az agonizmus operatív modelljében az E_m paraméter a receptorműködés jelerősítő funkciójának maximumát fejezi ki, ennél fogva az adott rendszerben elérhető maximális hatást mutatja (Black és Leff, 1983; Giraldo és mtsai, 2002). Annak a (számunkra) meglepően erős hatása, hogy az E_m értéke 100 vagy 100-nál kisebb, azzal lehet összefüggésben, hogy a mi esetünkben az $E_m = 100$ a rendszer jelerősítő képességének abszolút maximuma. Ez azért áll fenn, mert a mi eredeti *ex vivo* E/c görbéink (ld. 4. ábra) a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenéseként voltak definiálva, a kontrakciós erő pedig nem lehet kisebb, mint 0 (mivel negatív erejű pitvartevékenységeknek nincs biológiai értelme).

A teljesség kedvéért meg kell említeni, hogy a receptorműködés operatív modelljét az utóbbi időben több kritika érte néhány, az elméleti megfontolásait és a görbeillesztési tulajdonságait érintő hiányossága miatt. Ezek hatása - bírálói szerint - az operatív modell használatával kapott eredményeket érinti. A hiányosságok egyike, hogy teljes agonisták esetében az illesztett τ (operatív hatékonyság) bizonytalanul határozható meg, ami bizonytalanná teszi a vele együtt meghatározott K_A értéket is (ld. 5-8. egyenlet). Egy másik, sokkal inkább teoretikus hiányosság, hogy az operatív modell algebrailag - egyszerűsítések mentén - nem vezethető vissza olyan egyszerűbb modellekre (mint például a Hill egyenlet), amelyeket egyébként érvényesnek tart és fel is használ a modell (Giraldo és mtsai, 2002; Buchwald, 2017, 2019, 2020). *In silico* vizsgálatunkhoz mégis az operatív modellt választottuk E/c görbéink szimulálásához, részben általános volta és rugalmassága miatt (Black és Leff, 1983; Giraldo és mtsai, 2002), de legfőképpen azért, mert létezik egy olyan kiterjesztése, ami lehetővé teszi két agonista ugyanazon receptor populáción való egyidejű hatásának egzakt leírását (Leff és mtsai, 1993). A mért adatok illesztésekor jelentkező gyakorlati problémák a mi elméleti munkánk esetében természetesen nem relevánsak, a modellt érintő elméleti problémák viszont elvben befolyásolhatták *in silico* eredményeinket. Mivel azonban mi a szimulált E/c görbéket a korábbi *ex vivo* E/c görbékkel való minél nagyobb alaki hasonlóság elérésére hoztuk létre, vagyis konkrét paramétereiket nem

elemeztük, az operatív modell elméleti sajátosságai vizsgálatunk célját szerintünk nem veszélyeztették.

A továbbiakban szem előtt tartva az E_m paraméter kitüntetett szerepét az összetett E/c görbék viselkedésében (ld. 7. ábra, 1. és 2. modell), folytattuk a modellfejlesztést az *in silico* vizsgálat során. A 3. modell azt a forgatókönyvet valósította meg, miszerint nincs interakció az FSCPX és az NBTI között; a 4. modell abból indult ki, hogy van ilyen interakció, és az csak az endogén A agonista sorsát érinti (mely utóbbi a myocardialis interstitiumban termelődött adenzint szimbolizálja); a 4. modell 2. variánsa pedig olyan interakciót feltételez, ami mind az endogén, mind az exogén A agonista sorsát befolyásolja (ez utóbbi felel meg a E/c görbe felvétele során beadott adenzinnak). A C agonista X-kezelt és X+NB-kezelt E/c görbéinek egymáshoz képesti helyzete azt mutatta, hogy a 4. modell és annak 2. variánsa jobban követi a szimulált *ex vivo* E/c görbék viselkedését, mint a 3. modell (vö. 1., 8. és 9. ábra). Ez az eredmény az FSCPX és az NBTI közötti interakció létezése mellett szól. Ezen interakció részleteibe a kiindulási 4. modell és a 2 variáns összehasonlítása enged némi bepillantást. Tekintve az A agonista NB-kezelt és X+NB-kezelt E/c görbéinek egymáshoz képesti helyzetét, a 4. modell nagyobb hasonlóságot mutatott az eredeti *ex vivo* rendszerrel, mint a 4. modell 2. variánsa (vö. 1., 8. és 9. ábra). Ez azt támasztja alá, hogy az FSCPX előkezelés csak az NBTI endogén adenzinra kifejtett hatását gátolja.

Amennyiben hipotézist akarunk megfogalmazni az FSCPX általunk feltételezett, az A_1 receptor gátlásán kívüli tulajdonságáról, először azt kell leszögezni, hogy az FSCPX – szabad formában – már nincs jelen a rendszerben, amikor az NBTI belekerül. (Mint általában az irreverzibilis ligandok alkalmazása során, az FSCPX feleslegét is ki kell mosni a rendszerből egy bizonyos behatási idő elteltével.) Ez alapján a jellegzetes viselkedésért egy az FSCPX által irreverzibilisen módosított endogén molekula lehet a felelős (és nem például az FSCPX és az NBTI közvetlen interakciója). Munkacsoportunk egy korábbi *in silico* vizsgálata során azt a feltételezést tette, hogy az FSCPX az NBTI célpontját, az ENT1-et módosítja (Zsuga és mtsai, 2017). Ennek ellentmond a disszertációt megalapozó *in silico* vizsgálatunk azon eredménye, hogy a 4. modell alapverziója jobb, mint a 2. variáns (ld. fentebb).

Egy közelmúltbeli *ex vivo* vizsgálatunkban arra a hipotézisre jutottunk, hogy az FSCPX gátolhatja az interstitialis adenzin előállításában résztvevő valamelyik enzimet (esetleg többet is) (Erdei és mtsai, 2018). Ebben az esetben természetesen meg kell tudni magyarázni, hogy ha az FSCPX gátolja az interstitialis adenzin termelést, akkor ennek miért

nem látható a nyoma a csak FSCPX-kezelt E/c görbéken (a kontroll görbékhez képest) (4. ábra). Ennek oka az lehet, hogy az endogén adenozin nyugalmi interstitialis koncentrációja túl kicsi ahhoz, hogy érdemleges hatást gyakoroljon a kontroll E/c görbékre (Pák és mtsai, 2015), így az FSCPX előkezelés miatti csökkenése is észrevehetetlen maradhat. Ily módon az FSCPX nyugalmi interstitialis adenozin-szint csökkentő hatása csak akkor válik látványossá, ha egy másik behatás viszont növeli az endogén adenozin interstitialis koncentrációját, mint például a nukleozid transzport gátlása.

Az FSCPX A₁ receptor antagonistá tulajdonságán túli, elsőként munkacsoportunk által felvetett alternatív hatásmechanizmusa nem tekinthető tisztázottnak, így további vizsgálatokat igényel. Első lépésként érdemes lehet megvizsgálni, vajon az FSCPX képes-e gátolni ektonukleotidázokat, leginkább az ekto-apirázt (CD39) és/vagy az ekto-5'-nukleotidázt (CD73). A CD39 és a CD73, amellet, hogy immunológiai jelentőségű lymphocita sejtfelszíni markerek, a myocardialis interstitium adenozin termelésének legfontosabb enzimei (Fredholm és mtsai, 2001; Burnstock és Pelleg, 2015; Borea és mtsai, 2018). Ezen vizsgálatok megjósolható nehézsége, hogy míg az ektonukleotidázok (köztük a CD39 és CD73 is) membránkötött struktúrák (Zimmermann, 2000), akárcsak az A₁ receptor, tehát *ex vivo* és *in vivo* jól megközelíthetőek a lipidmembránokba beoldódó és ott perzisztáló FSCPX számára, addig az enzimaktivitási tesztek általában vizes közeget használó *in vitro* vizsgálatok, amelyekben az FSCPX sérülékeny lehet vízben való bomlékonysága miatt (van Muijlwijk-Koezen és mtsai, 2001).

In silico vizsgálatunk további eredménye annak valószínűsítése, hogy az NBTI általi ENT1 blokádnak nem szünteti meg teljesen a befelé irányuló transzmembrán adenozin transzportot a tengerimalac pitvari myocardiumon. Ez a következtetés a 4. modell alapváltozatának (8. ábra) és 1. variánsának (9. ábra) összevetése alapján vonható le: az alapváltozat jobban megközelíti a szimuláció által megcélzott eredeti *ex vivo* eredményeket (4. ábra). *In silico* vizsgálatunk ezen eredménye összhangban van azokkal a kísérleti eredményekkel, melyek szerint a szívben többféle nukleozid transzporter is működik az ekvilibratív és NBTI-szenzitív ENT1-en kívül (Dekanski és mtsai, 2004; Pastor-Anglada és Pérez-Torras, 2018).

A kérdés alapos körbejárása érdekében meg kell jegyezni, hogy mind a 4. modell, mind az 1. variáns tartalmaz egy olyan egyszerűsítő feltételezést, ami tisztán az *ex vivo* CPA és adenozin E/c görbék megjelenéséből (pontosabban egymáshoz képesti helyzetéből) indul ki. Nevezetesen, hogy a két A₁ receptor teljes agonista, a CPA és az adenozin között (NBTI

távollétében) az egyetlen különbség a(z ezeket érintő) befelé irányuló transzport hiánya (CPA) illetve megléte (adenozin). Ezt a feltételezést arra alapozva tettük meg, hogy a szintetikus CPA sorsát az adenozinhoz képest jóval kevésbé befolyásolják az adenozint átalakító, zömmel intracellulárisan elhelyezkedő enzimek (Pavan és IJzerman, 1998; Fredholm és mtsai, 2001). Ebből következően az *ex vivo* kísérlet során a cardiomyocita sejtmembránon átjutó CPA mennyisége jelentéktelen az extracellulárisan (főleg a preparátum szervkádbeli tápoldatában) jelenlévő CPA mennyiségéhez képest, mivel a CPA intracellulárisan csak kismértékben eliminálódik, ami alacsony szinten tartja a membránon keresztüli transzportját.

Összefoglalva, *in silico* vizsgálatunkban az FSCPX (irreverzibilis A₁ receptor antagonist) és az NBTI (adenozin transzport gátló) – hatásaik szintjén megnyilvánuló – paradox interakcióját igyekeztünk jobban megérteni. Munkacsoportunk először 2013-ban írta le, hogy tengerimalac bal pitvaron az FSCPX előkezelés növeli az adenozin E/c görbe maximumát, ha NBTI is jelen van (Kiss és mtsai, 2013). A disszertáció alapját képező *in silico* vizsgálatunk szerint ez a paradox interakció két egyidejű, additív, de egymástól független okra vezethető vissza. Az egyik ok az a jelenség, ami az RRM alapját is képezi, vagyis hogy az interstitialis adenozin többlet hatása az adenozin (hagyományos módon felvett) E/c görbéjére attól függ, hogy endogén eredetű-e (ami a E/c görbe felvétele előtt halmozódott fel), vagy pedig exogén-e (ami a E/c görbéhez beadott adenozin csökkent bomlása miatt maradt vissza): előbbi deprimálja és jobbra tolja, utóbbi balra tolja az adenozin E/c görbét (Gesztelyi és mtsai, 2004). Ezt az okot a munkacsoport már korábban is felvetette (Kiss és mtsai, 2013). A másik ok pedig az FSCPX és az NBTI hatásai közötti interferencia, amelyet a munkacsoport először *in silico* eredmények alapján hozott gyanúba (Zsuga és mtsai, 2017), majd legutóbbi *ex vivo* eredményeink alapján fogalmazott meg pontosabban (Erdei és mtsai, 2018). A pontosítás azt jelentette, hogy míg korábban elképzelhetőnek tűnt az NBTI hatásainak általános (FSCPX általi) gátlása, ami egyaránt érintette volna az endogén és az exogén adenozinra kifejtett hatást (Zsuga és mtsai, 2017), addig később az NBTI-nek már csak az endogén adenozinra gyakorolt hatása került okként szóba (Erdei és mtsai, 2018). A mostani *in silico* vizsgálat megerősítette ez utóbbi vizsgálat következtetéseit, miszerint az FSCPX (az A₁ receptor antagonizálásán túl) az endogén adenozin NBTI általi akkumulációját gátolja.

5.2. *Ex vivo* következtetések

Az RRM modellje egy sajátos farmakológiai jelenség egyszerűsített matematikai leírása, amikor is két agonista ugyanazt a hatást váltja ki ugyanabban a biológiai rendszerben oly módon, hogy egyikük egy kis időbeli előnnyel vált ki a választ, amit a másik agonista erre ráépülő hatásának kiértékelésekor figyelmen kívül hagyunk (ezáltal torzulást okozva) (Gesztelyi és mtsai, 2004; Grenцер és mtsai, 2010a). Az RRM-et eredetileg koncentráció-meghatározó módszerként fejlesztette ki munkacsoportunk, ami a modell illesztésén alapul. Az illesztés először a 10. egyenlettel történt (Gesztelyi és mtsai, 2004; Karsai és mtsai, 2006, 2007), majd az algebrailag ekvivalens, de a regresszió szempontjából megfelelőbb 11. egyenlet vette át a helyét (Grenцер és mtsai, 2010a, 2010b; Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014; Erdei és mtsai, 2018). Az illesztéshez szükséges biológiai (vagy szimulált) adatok olyan E/c görbék, amelyek egy torzító koncentráció jelenlétében kerültek felvételre, a cél pedig ennek a torzító koncentrációnak a kvantifikálása (a torzító koncentráció nélküli görbékre végzett illesztés csak önellenőrző funkcióval bír). Az illesztett modellnek tartalmaznia kell az intakt E/c kapcsolat empirikus (például Hill-féle) paramétereit, melyeket azonos körülmények között, de torzító koncentráció hiányában felvett E/c görbék szolgáltatják. Az RRM lényeges, számos lehetőséget rejtő tulajdonsága, hogy a torzító koncentráció agonistája és a E/c görbe felvételéhez használt agonista nem feltétlen kell, hogy azonos legyen (Gesztelyi és mtsai, 2004; Karsai és mtsai, 2006). Ily módon az RRM lehetőséget ad egy rövid féléletidejű agonista koncentrációjában beállt akut növekedés kvantifikálására. Ehhez a E/c görbéket egy hasonló (ugyanazon hatás lehetőleg ugyanazon mechanizmussal való kiváltására képes), de stabil agonistával kell felvenni ugyanabban a rendszerben. Megbízhatóságuk okán az ilyen E/c görbék alkalmasak egy az RRM-mel végzett kvantitatív meghatározásra. Ebben az esetben (vagyis ha a két agonista különbözik) az RRM a torzító koncentráció kvantifikálására egy helyettesítő paramétert fog szolgáltatni, még hozzá a stabil agonista ekvielektív koncentrációját. Ezzel az RRM segítségével olyan információhoz juthatunk, amelyet más módszerrel nem, vagy csak nagy nehézségek árán (drágán vagy körülményesen) szerezhethetnénk meg, mégpedig egy bomlékony agonista receptorközei koncentrációjának változásáról.

A receptorok down-regulációja és deszenzitizációja minden receptort (így az adenosin receptor családot is) érintő általános mechanizmus (Fredholm és mtsai, 2001; Mundell és Kelly, 2011; Deb és mtsai, 2019). Ez a jelenség különösen lényeges az A₁

receptor szempontjából, mivel a válaszkészségét érintő változások alapvető protektív és regeneratív működéseket befolyásolnak testszerte (Fredholm és mtsai, 2001, 2019; Burnstock és mtsai, 2010; Burnstock és Pelleg, 2015; Effendi és mtsai, 2020). Ezzel feltehetően szoros összefüggésben az A₁ receptor down-regulációja és deszenzitizációja lassabb folyamat, mint a legtöbb más receptoré (Fredholm és mtsai, 2001; Mundell és Kelly, 2011). Ennek köszönhetően az A₁ receptor (és természetesen posztreceptorális jelátviteli útjai) olyan biológiai rendszert képez(nek), amelyben az RRM időigényessége ellenére (mintegy 40 perc) sikeresen kivitelezhető. Ezzel összhangban az RRM első alkalmazása az endogén adozin interstitialis felhalmozódásának megbecslése volt nukleozid transzport gátló (dipyridamole illetve NBTI) jelenlétében, eu- és hyperthyreoid tengerimalacokból izolált bal pitvaron (Karsai és mtsai, 2006, 2007; Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014; Erdei és mtsai, 2018). Mivel az adozinnak igen rövid (másodperces) a felezési ideje az élő szövetekben (Pavan és IJzerman, 1998), a meghatározáshoz (a E/c görbék felvételéhez) CPA-ra is szükség volt, melynek féléletideje jóval hosszabb (Pavan és IJzerman, 1998), különösen vérmentes *ex vivo* myocardiumban (Gesztelyi és mtsai, 2004). Ennek megfelelően a befelé irányuló adozin transzport gátlása miatt interstitialisan megjelenő többlet adozin CPA-egyenértéke került meghatározásra a fentebb említett vizsgálatok során.

A későbbiekben az RRM kiaknázzhatónak bizonyult más alkalmazási területeken is. Egyrészt, az RRM koncepciója hasznos lehet minden olyan helyzet elemzésekor, amikor egy agonista akutan akkumulálódik egy szöveti kompartmentben, amely tartalmazza az agonista valamely receptorát. Ekkor a receptor látszólagos válaszkészsége megváltozik (amit pontosan meghatározhatunk például egy E/c görbe stabil agonistával való felvételével), ami téves interpretációra ad lehetőséget, ha a jelenség lényegét nem ismerjük (vagy nem gondolunk rá). Megfordítva a dolgot, ha egy agonista koncentrációjának akut növekedése után a megfelelő receptor látszólagos válaszkészségének változása nem követi az RRM modellje által leírtakat, valamilyen egyéb jelenség fellépésére lehet következtetni (pl. receptor szenzitizáció vagy deszenzitizáció, változás valamely, az adott agonista szintjét meghatározó enzim vagy transzporter aktivitásában). A munkacsoportnak egy ilyen eseményt sikerült tetten érnie egy korábbi vizsgálatok (CPA E/c görbék elemzése során), amikor is az A₁ adozinerg rendszer jelátviteli hatékonyságának növekedését tapasztalta pentostatin általi adozin dezamináz gátlás alatt hyperthyreoid tengerimalac pitvaron (Kemény-Beke és mtsai, 2007). Másrészt, az RRM által szolgáltatott adatok felhasználhatóak olyan E/c görbék korrigálására is, amelyeket egy előzőleg ismeretlen

menyiségben felszaporodott agonista torzított. (Ennek jelentőségét az adja, hogy ezeket a torzulásokat általában figyelmen kívül szokták hagyni, mint olyan hibákat, amelyekkel nem lehet mit kezdeni.) Az NBTI jelenlétében készült, majd korrigált adenosin E/c görbék a munkacsoport néhány korábbi vizsgálatában lehetővé tették az adenosin negatív inotróp hatásához tartozó receptor rezerv kvalitatív meghatározását eu- és hyperthyreoid tengerimalac pitvarokon (Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014). Megjegyzendő, hogy ezt a receptor rezervet előzőleg hagyományos módszerekkel nem sikerült meghatározni (feltehetőleg az adenosin rövid féléletideje miatt) (Gesztelyi és mtsai, 2013), noha a szív adenosinerg rendszerét jellemző receptor rezerv értékeknek nagy jelentősége van (Dhalla és mtsai, 2003), akár még diagnosztikus szempontból is (Fenouillet és mtsai, 2019). Végül, természetesen, az RRM-mel nyert adatok (input adatokként) felhasználhatóak olyan *in silico* vizsgálatokhoz is, melyek célja az RRM (Grenczer és mtsai, 2010a, 2010b) vagy a pitvari myocardium adenosinerg mechanizmusainak (Zsuga és mtsai, 2017) jobb megismerése.

Fontos – és egyben önkritikus is – annak megállapítása, hogy az összes korábbi vizsgálatban a munkacsoport abból a két feltételezésből indult ki az RRM alkalmazása során, hogy az azonos koncentrációhoz tartozó adatpontok (replikátumok) szórása normális eloszlást követ, továbbá ez a szórás azonos mértékű a különböző koncentrációk esetében. Ez a megközelítés azonban kizárólag azon a szakmai közvélekedésen nyugodott, mely szerint ez a két feltételezés általában igaz a biológiai rendszerekből származó (tehát multikauzális), nem transzformált (legfeljebb normalizált vagy logaritmált) adatokra (Motulsky és Christopoulos, 2004; Prism 8 Curve Fitting Guide, 2019; McDonald, 2009). *Ex vivo* vizsgálatunk egyik célja tehát ennek a kérdésnek a megnyugtató tisztázása volt a mi biológiai rendszerünkben és kísérleti módszereink alkalmazása mellett, vagyis annak felderítése, hogy más feltételezésekből kiindulva javítható-e adatainkon az RRM becsléseinek pontossága illetve megbízhatósága (ezáltal az RRM használhatósága). Másik célunk a görbeillesztés két módjának, az individuális és globális regresszióknak az összehasonlítása volt. Az összetartozó görbepárok globális regresszióját a klasszikus individuális illesztés továbbfejlesztésének tartják, ami képes csökkenteni az illesztés bizonytalanságát (Motulsky és Christopoulos, 2004; Prism 8 Curve Fitting Guide, 2019).

Az értekezést megalapozó *ex vivo* vizsgálat illesztésre szánt E/c görbéinek felvételéhez három jól bevált vegyületet választottunk (NECA, CPA, CHA). A NECA mind az A₁, mind az A₂ adenosin receptor típust stimulálja, míg a CPA és a CHA szelektív agonistái az A₁ receptornak (Fredholm és mtsai, 2001; Deb és mtsai, 2019), ami a

myocardium fő adenosin receptor típusa (Endoh, 1999; Fredholm és mtsai, 2001). A NECA, CPA és CHA, szintetikus vegyületek lévén, lényegesen rosszabb szubsztátjai az adenosint bontó illetve tovább építő enzimeknek, valamint a nukleozidok transzportereinek, mint maga az adenosin (Fredholm és mtsai, 2001; Pavan és IJerman, 1998), ezért a velük készített E/c görbék alkalmasabbak kvantitatív kiértékelésre, mint az adenosin E/c görbéi (Gesztelyi és mtsai, 2013). A NECA, a CPA és a CHA által stimulált A₁ receptor ugyanakkor valamelyest eltérő preferenciával kapcsolódik a sejtmembránban jelen lévő különböző G proteinekhez (Verzyl és Ijerman, 2011), ezért vizsgálatainkat indokoltnak tartottuk mindhárom agonistával elvégezni.

Ex vivo vizsgálatunk egyik megállapítása az, hogy az általánosan elfogadott nézet, mely szerint biológiai kísérletek eredményeinek elemzésekor az adatok normalitásából és heteroszkedaszticitásából érdemes kiindulni, megállja a helyét a mi *ex vivo* kísérleti elrendezésünk által nyújtott adatok RRM-mel való kiértékelése esetén is. Ebből következően az RRM használata során az elsőként választandó megközelítés a súlyozás nélküli hagyományos (ordinary) regresszió. A becslések pontossága szempontjából a robusztus regresszió is jó választás (ha a görbeillesztő szoftverben van rá lehetőség), mi több, sokszor pontosabb eredményt szolgáltat, mint a hagyományos illesztés. A hagyományos regresszió mellett szól azonban, hogy a robusztus regresszió a becslésekhez nem ad meg 95%-os konfidencia intervallumot, amellyel a görbeillesztés precizitása (és ezáltal a megbízhatósága) megítélhető lenne (Motulsky és Christopoulos, 2004; Prism 8 Curve Fitting Guide, 2019).

Ex vivo vizsgálatunk eredményei alapján ugyanakkor a klasszikus individuális görbeillesztés pontosabb és megbízhatóbb (noha kevésbé kényelmes) eszköze az RRM kivitelezésének, mint a modernebb globális regresszió. Ennek a meglepő tapasztalatunknak a háttérében az állhat, hogy a két összetartozó E/c görbe közül az intakt (torzítatlan) görbéhez tartozó regressziós paraméternek ($\log c_x$) nincs definitív értéke, mivel a *per definitionem* várható becslésnek (nulla) nincs logaritmusa. Ez a probléma nem jelentkezik, ha az RRM kivitelezésekor individuális regressziót alkalmazunk, mivel akkor az intakt E/c görbére a Hill egyenletet (14. egyenlet) kell illeszteni, ami a regressziós paraméterek (E_{max} , EC_{50} , n) számára megbízható értékeket biztosít (ezeket kell végül behelyettesíteni a 11. egyenletbe a megfelelő torzult E/c görbe illesztéséhez). Ily módon az RRM számára az individuális illesztési mód ajánlható.

5.3. Vizsgálataink általános következtetései

PhD munkám két vizsgálatot foglal magában. Egyrészt két, eltérő támadáspontú adenozin analóg, az FSCPX (szelektív, irreverzibilis A₁ adenozin receptor antagonista) és az NBTI (szelektív nukleozid transzport gátló) interakcióját vizsgáltam korábbi *ex vivo* kísérleti adatok komputer szimulációs reprodukciója segítségével. A másik vizsgálat során az RRM optimális kivitelezési módját kerestem egy másik korábbi *ex vivo* kísérlet adatainak elemzése révén. A két terület közötti kapcsolatot egyrészt az képezi, hogy az *ex vivo* adatok ugyanazzal a metodikával készültek ugyanazon a szövettípuson (tengerimalac bal pitvari myocardium), másrészt az, hogy legfontosabb eszközünk mindkét vizsgálat során az RRM volt.

Az RRM a (farmakológiai értelemben vett) receptorok működésének és az ezt tükröző E/c görbék felvételének sajátosságain alapszik. Mivel a receptorok aktiválásával kiváltható válasz fix nagyságú, a E/c görbéről leolvasható hatás maximuma függ a receptorok átlagos aktiváltsági fokától a E/c görbe indításakor. A teljes válaszadási kapacitás csak akkor mutatkozik meg a E/c görbén, ha a receptorok (és a mögöttes jelátviteli rendszer) aktiválatlan (nyugalmi) állapotban voltak közvetlenül a E/c görbe felvétele előtt. Amennyiben ez nem teljesül, a válaszadási kapacitás látszólagos (a E/c görbéről leolvasható) csökkenése összefüggést mutat a receptorok átlagos aktiváltsági állapotával (a E/c görbe indításakor). Ez utóbbi viszont annak az agonista koncentrációnak a függvénye, ami a E/c görbe felvétele előtt már a rendszerben volt. (A könnyebb matematikai kezelhetőség érdekében feltételezzük, hogy az előzetesen jelen lévő – tehát a torzulást okozó – agonista megegyezik a E/c görbe felvételéhez használt agonistával.) A fentebb vázolt kapcsolatot fejezi ki a 10. (és persze a 11.) egyenlet.

Az RRM – egzaktsága folytán – jól használható komputer szimulációs vizsgálatokhoz (amennyiben természetesen az RRM alkalmazhatóságának feltételei fennállnak: Gesztelyi és mtsai, 2004; Greczer és mtsai, 2010a, 2010b). A jelen disszertációt megalapozó *in silico* vizsgálatunk során az RRM elengedhetetlen volt az NBTI és az FSCPX interakciójának modellezéséhez, mivel az NBTI a fiziológias adenozin homeosztázis felborításával jelentősen növeli a rendszerben lévő A₁ receptorok aktiváltsági állapotát (és torzítja ezáltal az A₁ receptor agonistával későbbiekben felveendő E/c görbét). Maga az NBTI pedig azért nélkülözhetetlen az FSCPX általunk újonnan feltételezett hatásának vizsgálatához, mert a fiziológias interstitialis adenozin koncentráció túl kicsi ahhoz, hogy érdemlegesen stimulálja

a myocardialis A_1 receptorokat (rendszerünkben is, ld.: Pak és mtsai, 2015). Az FSCPX feltételezett hatása az interstitialis adenzin termelésre tehát csak úgy érhető tetten (E/c görbe felvételével), ha NBTI-vel előzetesen megnöveljük az interstitialis adenzin-szintet (vagyis felerősítünk minden, az interstitialis adenzin-szintet érintő változást). Vizsgálatunkban az FSCPX interstitialis adenzin termelésre kifejtett gátló hatását sikerült *in silico* igazolni.

In silico vizsgálat során természetesen nincs relevanciája, mért biológiai adatok kiértékelésekor azonban nagy gyakorlati jelentőségű, hogy az RRM egyenletét (11. egyenlet) milyen beállításokkal illetve milyen módon illesztjük. *Ex vivo* kísérleti adatokra való illesztés során teszteltük a különböző technikai lehetőségeket úgy, hogy figyelembe vettük ezek matematikai háttérét (feltételeit) is. A könnyű használhatóság szempontjából fontos eredményünk, hogy a szoftveres görbeillesztés szokásos alapbeállításai jól beváltak az RRM alkalmazásakor. Sajnálatos ugyanakkor, hogy az RRM kivitelezésének egyszerűsítésére egyelőre nem találtuk még meg a megfelelő eljárást, mivel a globális illesztés mint kényelmes és biztonságos lehetőség nem vált be (legalábbis az általunk kipróbált módon).

6. Az új eredmények összefoglalása

Az értekezést megalapozó *in silico* vizsgálataink során egyrészt megállapítottuk, hogy az agonizmus operatív modelljének E_m paramétere (ld. 6-8. egyenlet) a korábbi elképzeléseinkhez képest meglepő mértékben befolyásolja a mi összetett E/c görbéink viselkedését (vagyis azokét, amelyek két agonista szimultán hatását jelenítik meg úgy, hogy az egyiket nem vesszük figyelembe). Az E_m értékének megfelelő megválasztása meg tudja változtatni a szimulált összetett E/c görbékhez tartozó maximális válaszok sorrendjét, míg nem befolyásolja a szimulált egyszerű (torzulásmentes) E/c görbék maximális válasz szerinti sorrendjét. Ezen túlmenően *in silico* megfigyeléseinkkel megerősítettük az FSCPX és az NBTI hatásainak a mi kísérleti rendszerünkben fellépő interakciójára vonatkozó hipotézisünket, melyet néhány korábbi *ex vivo* vizsgálatunk eredményei alapján állítottunk fel. Hipotézisünk szerint az FSCPX azon túl, hogy közismert A_1 receptor antagonist, mérsékelni képes az ENT1 típusú nukleozid transzport gátló NBTI által okozott interstitialis adenzin felhalmozódást. Ennek az interakciónak a mechanizmusára vonatkozó *in silico* eredményeink szerint az FSCPX csak az endogén adenzin interstitialis akkumulációját gátolja (az exogén adenzinét pedig nem). További *in silico* eredményünk, hogy az NBTI feltehetően nem állítja le teljesen a sejtmembránon keresztüli, befelé irányuló adenzin transzportot tengerimalac pitvaron.

A jelen disszertációt megalapozó *ex vivo* kísérleti munka fő eredménye, hogy az RRM legpontosabb becsléseit súlyozás nélküli individuális illesztéssel lehet elérni, csaknem függetlenül attól, hogy Gauss eloszlást feltételező hagyományos (ordinary) vagy Lorentz eloszlásra optimalizált robusztus (robust) regressziót alkalmazunk-e. A megbízhatóság szempontjából ugyanakkor érdekesebb hagyományos regressziót végezni, mivel csak ennek révén juthatunk a görbeillesztés precizitásáról informáló 95%-os konfidencia intervallumokhoz (a becslések mellé). Vizsgálataink azt is megmutatták, hogy az RRM – az általa nyújtott lehetőségekhez képest – könnyen alkalmazható eljárás, ami nem igényel sem speciális, nagy kapacitású görbeillesztő szoftvert, sem magas szintű ismereteket a regresszióanalízis területén.

7. Summary of the findings

On one hand, during the *in silico* investigations underlying this thesis, we have found that E_m parameter of the operational model of agonism can influence the behavior of our complex E/c curves (reflecting the net of actions of two agonists while not accounting for one of them) to an unexpectedly great extent regarding our previous ideas. The appropriate change of E_m can alter the rank order of the complex curves regarding the maximal response, an effect not characteristic of our simple (unbiased) E/c curves (expressing the action of one agonist in a standard way). Furthermore, we have gained *in silico* evidence for an interference between effects of FSCPX and NBTI in our *ex vivo* experimental setting used in several earlier studies. This finding extends beyond the well-established A_1 adenosine receptor antagonist property of FSCPX, indicating an inhibitory action exerted by FSCPX on the interstitial adenosine accumulation produced by NBTI, a selective and potent blocker of the nucleoside transporter type ENT1. Regarding the mechanism of this interference, *in silico* evidence has been obtained supporting that FSCPX only inhibits the interstitial accumulation of endogenous (but not exogenous) adenosine. As an additional result, we have found that NBTI seems not to completely inhibit the inward adenosine flux in the guinea pig atrium.

On the other hand, the major finding of the *ex vivo* investigations underlying the present thesis is that the best estimates of RRM can be obtained via individual fitting without any weighting, almost irrespectively of the fact of whether ordinary (assuming Gaussian distribution) or robust (optimized for Lorentzian distribution) regression is chosen. However, regarding the reliability, it is worthwhile to perform an ordinary regression, as only this method provides 95% confidence intervals for the best-fit values informing us about precision of the curve fitting. Accordingly, RRM is a relatively (by comparison to the possibilities it offers) easy-to-use procedure that requires neither a heavy-duty curve fitting software nor a high level of knowledge concerning regression analysis.

8. Irodalom

8.1. A disszertáció elkészítéséhez felhasznált irodalom

1. Ai, W.; Pate, N.D.; Roop, P.; Malik, A.; Trew, M.L. Cardiac Electrical Modeling for Closed-loop Validation of Implantable Devices. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2019, doi:10.1109/TBME.2019.2917212
2. Alam, M.S.; Costales, M.G.; Cavanaugh, C.; Williams, K. Extracellular adenosine generation in the regulation of pro-inflammatory responses and pathogen colonization. *Biomolecules* 2015, 5, 775–792. doi:10.3390/biom5020775
3. Andoh, T.; Kobayashi, N.; Uta, D.; Kuraishi, Y. Prophylactic topical paeoniflorin prevents mechanical allodynia caused by paclitaxel in mice through adenosine A(1) receptors. *Phytomedicine* 2017, 25, 1–7. doi:10.1016/j.phymed.2016.12.010
4. Bassingthwaighe, J.B. Interstitial adenosine: the measurement, the interpretation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1992, 24, 337–346. doi:10.1016/0022-2828(92)93188-p
5. Belardinelli, L.; Shryock, J.C.; Song, Y.; Wang, D.; Srinivas, M. Ionic basis of the electrophysiological actions of adenosine on cardiomyocytes. *FASEB J.* 1995, 9, 359–365. doi:10.1096/fasebj.9.5.7896004
6. Bindslev, N. Chapter 5: Complex agonism. In: *Drug-Acceptor Interactions*. doi:10.3402/bindslev.2008.8
7. Black, J.W.; Leff, P. Operational models of pharmacological agonism. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 1983, 220, 141–162. doi:10.1098/rspb.1983.0093
8. Borea, P.A.; Gessi, S.; Merighi, S.; Vincenzi, F.; Varani, K. Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. *Physiol Rev.* 2018, 98, 1591–1625. doi:10.1152/physrev.00049.2017
9. Buchwald, P. A Receptor Model with Binding Affinity, Activation Efficacy, and Signal Amplification Parameters for Complex Fractional Response Versus Occupancy Data. *Front. Pharmacol.* 2019, 10, 605. doi:10.3389/fphar.2019.00605
10. Buchwald, P. A single unified model for fitting simple to complex receptor response data. *Sci Rep.* 2020, 10, 13386. doi:10.1038/s41598-020-70220-w

11. Buchwald, P. A three-parameter two-state model of receptor function that incorporates affinity, efficacy, and signal amplification. *Pharmacol. Res. Perspect.* 2017, 5, e00311. doi:10.1002/prp2.311
12. Burnstock, G. Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience* 1976, 1, 239–248. doi:10.1016/0306-4522(76)90054-3
13. Burnstock, G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev.* 1972, 24, 509–581. PMID: 4404211
14. Burnstock, G. Purine and purinergic receptors. *Brain Neurosci. Adv.* 2018, 2, 2398212818817494. doi:10.1177/2398212818817494
15. Burnstock, G.; Fredholm, B.B.; North, R.A.; Verkhratsky, A. The birth and postnatal development of purinergic signalling. *Acta Physiol.* 2010, 199, 93–147. doi:10.1111/j.1748-1716.2010.02114.x
16. Burnstock, G.; Pelleg, A. Cardiac purinergic signalling in health and disease. *Purinergic Signal.* 2015, 11, 1–46. doi:10.1007/s11302-014-9436-1
17. Chen, J.F.; Eltzschig, H.K.; Fredholm, B.B. Adenosine receptors as drug targets - what are the challenges? *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2013, 12, 265–286. doi: 10.1038/nrd3955
18. Ciruela, F. Special Issue: G Protein-Coupled Adenosine Receptors: Molecular Aspects and Beyond. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 1997. doi:10.3390/ijms21061997
19. Colquhoun, D. Binding, gating, affinity and efficacy: the interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors. *Br. J. Pharmacol.* 1998, 125, 924–947. doi:10.1038/sj.bjp.0702164
20. Colquhoun, D. The quantitative analysis of drug-receptor interactions: A short history. *Trends Pharmacol. Sci.* 2006, 27, 149–157. doi:10.1016/j.tips.2006.01.008
21. Conant, A.R.; Jarvis, S.M. Nucleoside transport in guinea-pig myocardium. In: *Purine and Pyrimidine Metabolism in Man VII*; Harkness, R.A., Elion, G.B., Zöllner, N., Eds.; Springer: Boston, MA, USA, 1991; vol 309A, pp. 415–418.
22. Deb, P.K.; Deka, S.; Borah, P.; Abed, S.N.; Klotz, K.N. Medicinal Chemistry and Therapeutic Potential of Agonists, Antagonists and Allosteric Modulators of A1 Adenosine Receptor: Current Status and Perspectives. *Curr. Pharm. Des.* 2019, 25, 2697–2715. doi:10.2174/1381612825666190716100509

23. Dekanski, D.; Piperski, V.; Tasić, J.; Marković, I.D.; Jekanović, M.; Stukalov, P.; Mitrović, D.M. Transport of endogenous nucleosides in guinea pig heart. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2004, 82, 1061–1067. doi:10.1139/y04-114
24. Deussen, A. Metabolic flux rates of adenosine in the heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2000a, 362, 351–363. doi:10.1007/s002100000318
25. Deussen, A. Quantitative integration of different sites of adenosine metabolism in the heart. *Ann. Biomed. Eng.* 2000b, 28, 877–883. doi:10.1114/1.1308498
26. Deussen, A.; Stappert, M.; Schäfer, S.; Kelm, M. Quantification of extracellular and intracellular adenosine production: Understanding the transmembranous concentration gradient. *Circulation* 1999, 99, 2041–2047. doi:10.1161/01.CIR.99.15.2041
27. Deussen, A.; Weichsel, J.; Pexa, A. Features of adenosine metabolism of mouse heart. *Purinergic Signal.* 2006, 2, 663–668. doi:10.1007/s11302-006-9013-3
28. Dhalla, A.K.; Shryock, J.C.; Shreeniwas, R.; Belardinelli, L. Pharmacology and therapeutic applications of A₁ adenosine receptor ligands. *Curr. Top. Med. Chem.* 2003, 3, 369–385. doi:10.2174/1568026033392246
29. Effendi, W.I.; Nagano, T.; Kobayashi, K.; Nishimura, Y. Focusing on Adenosine Receptors as a Potential Targeted Therapy in Human Diseases. *Cells.* 2020, 9, E785. doi:10.3390/cells9030785
30. Elzein, E.; Zablocki, J. A₁ adenosine receptor agonists and their potential therapeutic applications. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2008, 17, 1901–1910. doi:10.1517/13543780802497284
31. Endoh, M. Dual inhibition of myocardial function through muscarinic and adenosine receptors in the mammalian heart. *J. Appl. Cardiol.* 1987, 2, 213–230.
32. Endoh, M. Muscarinic regulation of Ca²⁺ signaling in mammalian atrial and ventricular myocardium. *Eur. J. Pharmacol.* 1999, 375, 177–196. PMID:10443574
33. Erdei, T.; Szabo, A.M.; Lampe, N.; Szabo, K.; Kiss, R.; Zsuga, J.; Papp, C.; Pinter, A.; Szentmiklosi, A.J.; Szilvassy, Z.; Juhasz, B.; Gesztelyi, R. FSCPX, a Chemical Widely Used as an Irreversible A₁ Adenosine Receptor Antagonist, Modifies the Effect of NBTI, a Nucleoside Transport Inhibitor, by Reducing the Interstitial Adenosine Level in the Guinea Pig Atrium. *Molecules.* 2018, 23, E2186. doi:10.3390/molecules23092186

34. Fenouillet, E.; Mottola, G.; Kipson, N.; Paganelli, F.; Guieu, R.; Ruf, J. Adenosine Receptor Profiling Reveals an Association between the Presence of Spare Receptors and Cardiovascular Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, E5964. doi:10.3390/ijms20235964
35. Finlay, D.B.; Duffull, S.B.; Glass, M. 100 years of modelling ligand-receptor binding and response: a focus on GPCRs. *Br. J. Pharmacol.* 2020, doi:10.1111/bph.14988
36. Food-Info. Online tartalom: <http://www.food-info.net/uk/e/e630.htm> (letöltve 2020. április 28-án)
37. Fredholm, B.B.; Johansson, S.; Wang, Y.Q. Adenosine and the regulation of metabolism and body temperature. *Adv. Pharmacol.* 2011b, 61, 77–94. doi:10.1016/B978-0-12-385526-8.00003-5
38. Fredholm, B.B.; IJzerman, A.P.; Jacobson, K.A.; Klotz, K.N.; Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* 2001, 53, 527–552. PMID:11734617
39. Fredholm, B.B.; IJzerman, A.P.; Jacobson, K.A.; Linden, J.; Müller, C.E. IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology. Online tartalom: <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/ObjectDisplayForward?objectId=18> (letöltve 2019. április 22-én)
40. Fredholm, B.B.; IJzerman, A.P.; Jacobson, K.A.; Linden, J.; Müller, C.E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors - an update. *Pharmacol. Rev.* 2011a, 63, 1–34. doi:10.1124/pr.110.003285
41. Freilich, A.; Tepper, D. Adenosine and its cardiovascular effects. *Am. Heart J.* 1992, 123, 1324–1328. doi:10.1016/0002-8703(92)91040-8
42. Friedrichsen, M.; Mortensen, B.; Pehmøller, C.; Birk, J.B.; Wojtaszewski, J.F. Exercise-induced AMPK activity in skeletal muscle: role in glucose uptake and insulin sensitivity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2013, 366, 204–214. doi:10.1016/j.mce.2012.06.013
43. García-Herrera, C.M.; Celentano, D.J. Modelling and numerical simulation of the human aortic arch under in vivo conditions. *Biomech. Model. Mechanobiol.* 2013, 12, 1143–1154. doi:10.1007/s10237-013-0471-6
44. Gesztelyi, R.; Kiss, Z.; Wachal, Z.; Juhasz, B.; Bombicz, M.; Csepanyi, E.; Pak, K.; Zsuga, J.; Papp, C.; Galajda, Z.; Branzaniuc, K.; Porszasz, R.; Szentmiklosi, A.J.; Tosaki, A. The surmountable effect of FSCPX, an irreversible A(1) adenosine receptor antagonist, on

the negative inotropic action of A(1) adenosine receptor full agonists in isolated guinea pig left atria. *Arch. Pharm. Res.* 2013, 36, 293–305. doi:10.1007/s12272-013-0056-z

45. Gesztelyi, R.; Zsuga, J.; Hajdu, P.; Szabo, J.Z.; Cseppento, A.; Szentmiklosi, A.J. Positive inotropic effect of the inhibition of cyclic GMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE2) on guinea pig left atria in eu- and hyperthyroidism. *Gen. Physiol. Biophys.* 2003, 22, 501–513. PMID:15113122

46. Gesztelyi, R.; Zsuga, J.; Juhász, B.; Dér, P.; Vecsernyés, M.; Szentmiklósi, A.J. Concentration estimation via curve fitting: Quantification of negative inotropic agents by using a simple mathematical method in guinea pig atria. *Bull. Math. Biol.* 2004, 66, 1439–1453, doi:10.1016/j.bulm.2004.03.001

47. Gesztelyi, R.; Zsuga, J.; Kemeny-Beke, A.; Varga, B.; Juhasz, B.; Tosaki, A. The Hill equation and the origin of quantitative pharmacology. *Arch. Hist. Exact Sci.* 2012, 66, 427–438. doi:10.1007/s00407-012-0098-5

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

49. Goutelle, S.; Maurin, M.; Rougier, F.; Barbaut, X.; Bourguignon, L.; Ducher, M.; Maire, P. The Hill equation: A review of its capabilities in pharmacological modelling. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2008, 22, 633–648. doi:10.1111/j.1472-8206.2008.00633.x

50. Greczer, M.; Pinter, A.; Zsuga, J.; Kemeny-Beke, A.; Juhasz, B.; Szodoray, P.; Tosaki, A.; Gesztelyi, R. The influence of affinity, efficacy, and slope factor on the estimates obtained by the receptorial responsiveness method (RRM): A computer simulation study. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2010a, 88, 1061–1073. doi:10.1139/y10-078

51. Greczer, M.; Zsuga, J.; Majoros, L.; Pinter, A.; Kemeny-Beke, A.; Juhasz, B.; Tosaki, A.; Gesztelyi, R. Effect of asymmetry of concentration-response curves on the results obtained by the receptorial responsiveness method (RRM): An in silico study. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2010b, 88, 1074–1083. doi:10.1139/y10-089

52. Headrick, J.P.; Ashton, K.J.; Rose'meyer, R.B.; Peart, J.N. Cardiovascular adenosine receptors: expression, actions and interactions. *Pharmacol. Ther.* 2013, 140, 92–111. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.06.002

53. Headrick, J.P.; Hack, B.; Ashton, K.J. Acute adenosinergic cardioprotection in ischemic-reperfused hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003, 285, H1797–1818. doi:10.1152/ajpheart.00407.2003

54. Hill, A.V. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol. (London)* 1910, 40, Proceedings iv–vii.
55. Hong, H.; Regenstein, J.M.; Luo, Y. The importance of ATP-related compounds for the freshness and flavor of post-mortem fish and shellfish muscle: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2017, 57, 1787–1798. doi:10.1080/10408398.2014.1001489
56. Hwang, M.; Kwon, S.S.; Wi, J.; Park, M.; Lee, H.S.; Park, J.S.; Lee, Y.S.; Shim, E.B.; Pak, H.N. Virtual ablation for atrial fibrillation in personalized in-silico three-dimensional left atrial modeling: comparison with clinical catheter ablation. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2014, 116, 40–47. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2014.09.006
57. Karsai, D.; Gesztelyi, R.; Zsuga, J.; Jakab, A.; Szendrei, L.; Juhasz, B.; Bak, I.; Szabo, G.; Lekli, I.; Vecsernyes, M.; Varga, E.; Szentmiklosi, A.J.; Tosaki, A. Influence of hyperthyroidism on the effect of adenosine transport blockade assessed by a novel method in guinea pig atria. *Cell Biochem. Biophys.* 2007, 47, 45–52. doi:10.1385/CBB:47:1:45
58. Karsai, D.; Zsuga, J.; Juhász, B.; Dér, P.; Szentmiklósi, A.J.; Tósaki, A.; Gesztelyi, R. Effect of nucleoside transport blockade on the interstitial adenosine level characterized by a novel method in guinea pig atria. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2006, 47, 103–109. doi:10.1097/01.fjc.0000196239.51018.a0
59. Kemeny-Beke, A.; Jakab, A.; Zsuga, J.; Vecsernyes, M.; Karsai, D.; Pasztor, F.; Greczner, M.; Szentmiklosi, A.J.; Berta, A.; Gesztelyi, R. Adenosine deaminase inhibition enhances the inotropic response mediated by A1 adenosine receptor in hyperthyroid guinea pig atrium. *Pharmacol. Res.* 2007, 56, 124–131. doi:10.1016/j.phrs.2007.04.017
60. Kenakin, T.P. *A Pharmacology Primer: Techniques for More Effective and Strategic Drug Discovery*; Academic Press: London, UK, 2018.
61. Kiss, Z.; Pak, K.; Zsuga, J.; Juhasz, B.; Varga, B.; Szentmiklosi, A.J.; Haines, D.D.; Tosaki, A.; Gesztelyi, R. The guinea pig atrial A1 adenosine receptor reserve for the direct negative inotropic effect of adenosine. *Gen. Physiol. Biophys.* 2013, 32, 325–335. doi:10.4149/gpb_2013041
62. Kurachi, Y.; Nakajima, T.; Sugimoto, T. On the mechanism of activation of muscarinic K⁺ channels by adenosine in isolated atrial cells: Involvement of GTP-binding proteins. *Pflugers Arch.* 1986, 407, 264–274. PMID:2429251
63. Kwon, Y.S.; Nabeshima, T.; Shin, E.J.; Chun, W.; Jhoo, J.H.; Jhoo, W.K.; Wie, M.B.; Jang, C.G.; Chung, H.; Sung, Y.E.; Kim, H.C. PAP 9704, a Korean herbal medicine

attenuates methamphetamine-induced hyperlocomotion via adenosine A2A receptor stimulation in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 2004, 27, 906–909. doi:10.1248/bpb.27.906

64. Lazarus, M.; Chen, J.F.; Huang, Z.L.; Urade, Y.; Fredholm, B.B. Adenosine and Sleep. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2019, 253, 359–381. doi:10.1007/164_2017_36

65. Langemeijer, E.V.; Verzijl, D.; Dekker, S.J.; IJzerman, A.P. Functional selectivity of adenosine A1 receptor ligands? *Purinergic Signal.* 2013, 9, 91–100. doi:10.1007/s11302-012-9334-3

66. Leff, P.; Dougall, I.G.; Harper, D. Estimation of partial agonist affinity by interaction with a full agonist: A direct operational model-fitting approach. *Br. J. Pharmacol.* 1993, 110, 239–244. doi:10.1111/j.1476-5381.1993.tb13799.x

67. Lorenzen, A.; Beukers, M.W.; van der Graaf, P.H.; Lang, H.; van Muijlwijk-Koezen, J.; de Groote, M.; Menge, W.; Schwabe, U.; IJzerman, A.P. Modulation of agonist responses at the A(1) adenosine receptor by an irreversible antagonist, receptor-G protein uncoupling and by the G protein activation state. *Biochem. Pharmacol.* 2002, 64, 1251–1265. doi:10.1016/S0006-2952(02)01293-5

68. Ma, Y.; Gao, Z.; Xu, F.; Liu, L.; Luo, Q.; Shen, Y.; Wu, X.; Wu, X.; Sun, Y.; Wu, X.; Xu, Q. A novel combination of astilbin and low-dose methotrexate respectively targeting A(2A)AR and its ligand adenosine for the treatment of collagen-induced arthritis. *Biochem. Pharmacol.* 2018, 153, 269–281. doi:10.1016/j.bcp.2018.01.033

69. Marín-Aguilar, F.; Pavillard, L.E.; Giampieri, F.; Bullón, P.; Cordero, M.D. Adenosine Monophosphate (AMP)-Activated Protein Kinase: A New Target for Nutraceutical Compounds. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, E288. doi:10.3390/ijms18020288

70. McDonald, J.H. *Handbook of Biological Statistics*; Sparky House Publishing: Baltimore, MD, USA, 2009.

71. Morey, T.E.; Belardinelli, L.; Dennis, D.M. Validation of Furchgott's method to determine agonist-dependent A1-adenosine receptor reserve in guinea-pig atrium. *Br. J. Pharmacol.* 1998, 123, 1425–1433. doi:10.1038/sj.bjp.0701747

72. Motulsky, H.J.; Christopoulos, A. *Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting*; GraphPad Software Inc.: San Diego, CA, USA, 2004.

73. Mundell, S.; Kelly, E. Adenosine receptor desensitization and trafficking. *Biochim. Biophys. Acta* 2011, 1808, 1319–1328. doi:10.1016/j.bbamem.2010.06.007

74. Neubig, R.R; Spedding, M; Kenakin, T; Christopoulos, A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 2003, 55, 597–606. doi:10.1124/pr.55.4.4
75. Nicolaidis, S. Metabolic mechanism of wakefulness (and hunger) and sleep (and satiety): Role of adenosine triphosphate and hypocretin and other peptides. *Metabolism* 2006, 55, S24-29. doi:10.1016/j.metabol.2006.07.009
76. Pak, K.; Papp, C.; Galajda, Z.; Szerafin, T.; Varga, B.; Juhasz, B.; Haines, D.; Szentmiklosi, A.J.; Tosaki, A.; Gesztelyi, R. Approximation of A1 adenosine receptor reserve appertaining to the direct negative inotropic effect of adenosine in hyperthyroid guinea pig left atria. *Gen. Physiol. Biophys.* 2014, 33, 177–188. doi:10.4149/gpb_2013079
77. Pak, K.; Zsuga, J.; Kepes, Z.; Erdei, T.; Varga, B.; Juhasz, B.; Szentmiklosi, A.J.; Gesztelyi, R. The effect of adenosine deaminase inhibition on the A1 adenosinergic and M2 muscarinergic control of contractility in eu- and hyperthyroid guinea pig atria. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2015, 388, 853–868. doi:10.1007/s00210-015-1121-6
78. Park, J.H.; Kim, J.S.; Jang, D.S.; Lee, S.M. Effect of *Polygala tenuifolia* root extract on cerebral ischemia and reperfusion. *Am. J. Chin. Med.* 2006, 34, 115–23. doi:10.1142/S0192415X06003680
79. Pastor-Anglada, M.; Pérez-Torras, S. Who Is Who in Adenosine Transport. *Front Pharmacol.* 2018, 9, 627. doi: 10.3389/fphar.2018.00627
80. Pavan, B.; IJzerman, A.P. Processing of adenosine receptor agonists in rat and human whole blood. *Biochem. Pharmacol.* 1998, 56, 1625–1632. doi:10.1016/S0006-2952(98)00270-6
81. Prism 8 Curve Fitting Guide; GraphPad Software Inc.: La Jolla, CA, USA. Online tartalom: <https://www.graphpad.com/guides/prism/8/curve-fitting/index.htm> (letöltve 2019. szeptember 24-én)
82. Ramakers, B.P.; Pickkers, P.; Deussen, A.; Rongen, G.A.; van den Broek, P.; van der Hoeven, J.G.; Smits, P.; Riksen, N.P. Measurement of the endogenous adenosine concentration in humans in vivo: methodological considerations. *Curr. Drug Metab.* 2008, 9, 679–685. doi:10.2174/138920008786049249
83. Rang, H.P. The receptor concept: pharmacology's big idea. *Br. J. Pharmacol.* 2006, 147, S9–S16. doi:10.1038/sj.bjp.0706457

84. Rezvani, M.E.; Roohbakhsh, A.; Allahtavakoli, M.; Shamsizadeh, A. Anticonvulsant effect of aqueous extract of *Valeriana officinalis* in amygdala-kindled rats: possible involvement of adenosine. *J. Ethnopharmacol.* 2010, 127, 313–318. doi:10.1016/j.jep.2009.11.002
85. Roche, D.; Gil, D.; Giraldo, J. Mathematical modeling of G protein-coupled receptor function: What can we learn from empirical and mechanistic models? *Adv. Exp. Med. Biol.* 2014, 796, 159–181. doi:10.1007/978-94-007-7423-0_8
86. Romano, N.; Ceci, M. The face of epicardial and endocardial derived cells in zebrafish. *Exp. Cell Res.* 2018, 369, 166–175. doi:10.1016/j.yexcr.2018.05.022
87. Ruffolo, R.R., Jr. Review - important concepts of receptor theory. *J. Auton. Pharmacol.* 1982, 2, 277–295. doi:10.1111/j.1474-8673.1982.tb00520.x
88. Scammells, P.J.; Baker, S.P.; Belardinelli, L.; Olsson, R.A. Substituted 1,3-dipropylxanthines as irreversible antagonists of A1 adenosine receptors. *J. Med. Chem.* 1994, 37, 2704–2712. doi:10.1021/jm00043a010
89. Shryock, J.C.; Belardinelli, L. Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am. J. Cardiol.* 1997, 79, 2–10. doi:10.1016/s0002-9149(97)00256-7
90. Srinivas, M.; Shryock, J.C.; Scammells, P.J.; Ruble, J.; Baker, S.P.; Belardinelli, L. A novel irreversible antagonist of the A1-adenosine receptor. *Mol. Pharmacol.* 1996, 50, 196–205. doi:0026–895X196/010196-10\$3.00/0
91. Szentmiklosi, A.J.; Cseppento, A.; Harmati, G.; Nanasi, P.P. Novel trends in the treatment of cardiovascular disorders: site- and event- selective adenosinergic drugs. *Curr. Med. Chem.* 2011, 18, 1164–1187. doi:10.2174/092986711795029753
92. Szentmiklosi, A.J.; Galajda, Z.; Cseppento, Á.; Gesztelyi, R.; Susán, Z.; Hegyi, B.; Nánási, P.P. The Janus face of adenosine: antiarrhythmic and proarrhythmic actions. *Curr. Pharm. Des.* 2015, 21, 965–976. doi:10.2174/1381612820666141029100346
93. Thorn, J.A.; Jarvis, S.M. Adenosine transporters. *Gen. Pharmacol.* 1996, 27, 613–620. doi:10.1016/0306-3623(95)02053-5
94. Tsai, C.F.; Huang, C.L.; Lin, Y.L.; Lee, Y.C.; Yang, Y.C.; Huang, N.K. The neuroprotective effects of an extract of *Gastrodia elata*. *J. Ethnopharmacol.* 2011, 138, 119–125. doi:10.1016/j.jep.2011.08.064

95. Ullah, I.; Park, H.Y.; Kim, M.O. Anthocyanins protect against kainic acid-induced excitotoxicity and apoptosis via ROS-activated AMPK pathway in hippocampal neurons. *CNS Neurosci. Ther.* 2014, 20, 327–338. doi:10.1111/cns.12218
96. van Muijlwijk-Koezen, J.E.; Timmerman, H.; van der Sluis, R.P.; van de Stolpe, A.C.; Menge, W.M.; Beukers, M.W.; van der Graaf, P.H.; de Groote, M.; IJzerman, A.P. Synthesis and use of FSCPX, an irreversible adenosine A1 antagonist, as a 'receptor knock-down' tool. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001, 11, 815–818. doi:10.1016/s0960-894x(01)00069-5
97. Vecchio, E.A.; Baltos, J.A.; Nguyen, A.T.N.; Christopoulos, A.; White, P.J.; May, L.T. New paradigms in adenosine receptor pharmacology: allostery, oligomerization and biased agonism. *Br J Pharmacol.* 2018, 175, 4036–4046. doi:10.1111/bph.14337
98. Verzijl, D.; Ijzerman, A.P. Functional selectivity of adenosine receptor ligands. *Purinergic Signal.* 2011, 7, 171–192. doi:10.1007/s11302-011-9232-0
99. Weiss, J.N. The Hill equation revisited: uses and misuses. *FASEB J.* 1997, 11, 835–841. doi:10.1096/fasebj.11.11.9285481
100. Wilbur, S.L.; Marchlinski, F.E. Adenosine as an antiarrhythmic agent. *Am. J. Cardiol.* 1997, 79, 30–37. doi:10.1016/s0002-9149(97)00261-0
101. Zeng, M.; Zhang, L.; Zhang, B.; Li, B.; Kan, Y.; Yang, H.; Feng, W.; Zheng, X. Chinese yam extract and adenosine attenuated LPS-induced cardiac dysfunction by inhibiting RAS and apoptosis via the ER-mediated activation of SHC/Ras/Raf1 pathway. *Phytomedicine* 2019, 61, 152857. doi:10.1016/j.phymed.2019.152857
102. Zimmermann, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2000, 362, 299–309. doi:10.1007/s002100000309
103. Zsuga, J.; Erdei, T.; Szabó, K.; Lampe, N.; Papp, C.; Pinter, A.; Szentmiklosi, A.J.; Juhasz, B.; Szilvássy, Z.; Gesztelyi, R. Methodical Challenges and a Possible Resolution in the Assessment of Receptor Reserve for Adenosine, an Agonist with Short Half-Life. *Molecules.* 2017, 22, E839. doi:10.3390/molecules22050839



Nyilvántartási szám: DEENK/188/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szabó Adrienn Mónika

Neptun kód: AAVLFR

Doktori Iskola: Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szabó, A. M.**, Viczján, G., Erdei, T. D., Simon, I., Kiss, R., Szentmiklósi, J. A., Juhász, B., Papp, C., Zsuga, J., Pintér, Á., Szilvássy, Z., Gesztelyi, R.: Accuracy and Precision of the Receptorial Responsiveness Method (RRM) in the Quantification of A1 Adenosine Receptor Agonists.
Int. J. Mol. Sci. 20 (24), 6264-6277, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20246264>
IF: 4.183 (2018)
2. **Szabó, A. M.**, Erdei, T. D., Viczján, G., Kiss, R., Zsuga, J., Papp, C., Pintér, Á., Juhász, B., Szilvássy, Z., Gesztelyi, R.: An Advanced in silico Modelling of the Interaction between FSCPX, an Irreversible A1 Adenosine Receptor Antagonist, and NBTI, a Nucleoside Transport Inhibitor, in the Guinea Pig Atrium.
Molecules. 24 (12), 1-16, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24122207>
IF: 3.06 (2018)

További közlemények

3. Wachal, Z., Bombicz, M., Priksz, D., Hegedűs, C., Kovács, D. K., **Szabó, A. M.**, Kiss, R., Németh, J., Juhász, B., Szilvássy, Z., Varga, B.: Retinoprotection by BGP-15, a Hydroxamic Acid Derivative, in a Type II Diabetic Rat Model Compared to Glibenclamide, Metformin, and Pioglitazone.
Int. J. Mol. Sci. 21 (6), 1-19, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21062124>
IF: 4.183 (2018)





4. Erdei, T. D., **Szabó, A. M.**, Lampé, N., Szabó, K., Kiss, R., Zsuga, J., Papp, C., Pintér, Á., Szentmiklósi, J. A., Szilvássy, Z., Juhász, B., Gesztelyi, R.: FSCPX, a chemical widely used as an irreversible A1 adenosine receptor antagonist, modifies the effect of NBTI, a nucleoside transport inhibitor, by reducing the interstitial adenosine level in the guinea pig atrium. *Molecules*. 23 (9), 1-17, 2018.
DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23092186>
IF: 3.06
5. Varga, B., Priksz, D., Lampé, N., Bombicz, M., Kurucz, A., **Szabó, A. M.**, Pósa, A., Szabó, R., Kemény-Beke, Á., Gálné Remenyik, J., Gesztelyi, R., Juhász, B.: Protective Effect of Prunus Cerasus (Sour Cherry) Seed Extract on the Recovery of Ischemia/Reperfusion-Induced Retinal Damage in Zucker Diabetic Fatty Rat. *Molecules*. 22 (10), [1-12], 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules22101782>
IF: 3.098
6. Varga, B., Gesztelyi, R., Bombicz, M., Haines, D. D., **Szabó, A. M.**, Kemény-Beke, Á., Antal, M., Vecsernyés, M., Juhász, B., Tószaki, Á.: Protective Effect of Alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone (α -MSH) on the Recovery of Ischemia/Reperfusion (I/R)-Induced Retinal Damage in A Rat Model. *J. Mol. Neurosci.* 50 (3), 558-570, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12031-013-9998-3>
IF: 2.757
7. Zsuga, J., Gesztelyi, R., Kemény-Beke, Á., Fekete, K., Mihálka, L., **Szabó, A. M.**, Kardos, L., Csiba, L., Bereczki, D.: Different effect of hyperglycemia on stroke outcome in non-diabetic and diabetic patients: a cohort study. *Neurol. Res.* 34 (1), 72-79, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1179/1743132811Y.00000000062>
IF: 1.182

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 21,523

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
7,243**

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

Debrecen, 2020.06.12.



9. Tárgyszavak

Magyar tárgyszavak: adenozin; A₁ adenozin receptor; NECA; CPA; CHA; FSCPX; NBTI; operatív modell; receptoriális válaszkészség módszer; RRM; komputer szimuláció; nemlineáris regresszió; pitvar; szív

Angol tárgyszavak: adenosine; A₁ adenosine receptor; NECA; CPA; CHA; FSCPX; NBTI; operational model; receptorial responsiveness method; RRM; computer simulation; nonlinear regression; atrium; heart

10. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki Dr. Szilvássy Zoltán egyetemi tanárnak, egyetemünk rektorának, hogy lehetővé tette munkám elvégzését az általa vezetett intézetben (DE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet).

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

Köszönöm témavezetőm csapatának a sok segítséget, amit egy klinikus számára adtak, hogy ez az értekezés létrejöhessen: Dr. Erdei Tamás, Dr. Lampé Nóra és Viczján Gábor PhD hallgatóknak, valamint Juhász Ildikó asszisztensnek.

Köszönetet mondok munkahelyem vezetőinek, Dr. Balla József egyetemi tanárnak (DE KK Belgyógyászati Intézet) és Dr. Tarr Tünde egyetemi docensnek (DE KK Belgyógyászati Intézet C Épület), továbbá közvetlen kollégáimnak.

Köszönöm családomnak, különösen férjemnek, Dr. Varga Balázsnak, a sok segítséget, a gyermekeimnek, hogy türelmesek voltak, édesanyámnak, édesapámnak, anyósomnak és apósomnak, hogy a felkészülési idő alatt végig támogattak.

PhD munkám anyagi feltételeit a „HU-MATHS-IN – Magyar Ipari Innovációs Matematikai Szolgáltatási Hálózat tevékenységének elmélyítése” pályázat (EFOP-3.6.2-16-2017-00015) biztosította. További segítséget jelentett az Innovációs és Technológiai Minisztérium által meghirdetett Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program (NKFIH-1150-6/2019) a Debreceni Egyetem Terápiás célú fejlesztések tématerületi programja keretében, továbbá „A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban” projekt keretében az Európai Unió támogatásával az Európai Regionális Fejlesztési Alap (GINOP-2.3.4-15-2016-00002), valamint a Tématerületi Kiválósági Program 2019 (ED_18-1-2019-0028).