

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

Dr. Erdei Tamás Dániel

TÉMAVEZETŐ: Dr. Gesztelyi Rudolf



DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2021.

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Erdei Tamás Dániel okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok Doktori Iskolája  
(Mozgásszervi betegségek programja) keretében

Témavezető: Dr. Gesztelyi Rudolf, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Pósa Anikó, PhD

Dr. Lekli István, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Illés Árpád, az MTA Doktora

tagok: Prof. Dr. Pethő Gábor, az MTA Doktora

Dr. Pósa Anikó, PhD

Dr. Lekli István, PhD

Dr. Majoros László, PhD

Az értekezés védeése online történik 2021.06.16-án 13:00 órai kezdettel.

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze az [erdeitomi9992@gmail.com](mailto:erdeitomi9992@gmail.com) email címre a vitát megelőző napon (2021. június 15.) 16:00-ig. A tárgymezőbe kérjük beírni: Erdei Tamás Dániel részvételi szándék.

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

*Németh László  
(után szabadon)*

# Tartalomjegyzék

<b>1. Bevezetés.....</b>	<b>1</b>
1.1. Célkitűzések.....	1
1.2. Az adenozinerg rendszer.....	1
1.3. A <sub>1</sub> adenzin receptor ligandok.....	2
1.4. Az A <sub>1</sub> adenzin receptor rezerv.....	3
1.5. Az alkalmazott matematikai modellek.....	4
1.5.1. A Hill egyenlet.....	4
1.5.2. Az agonizmus operatív modellje.....	4
1.5.3. A receptoriális válaszkészség módszer (RRM).....	5
1.6. A disszertáció alapjául szolgáló vizsgálat előzményei.....	5
<b>2. Anyagok és módszerek.....</b>	<b>7</b>
2.1. <i>In silico</i> módszerek.....	7
2.2. Anyagok és <i>ex vivo</i> módszerek.....	9
2.2.1. Vegyszerek és oldatok.....	9
2.2.2. Állatok és preparátumok.....	10
2.2.3. Az <i>ex vivo</i> vizsgálat csoportjai és protokolljai.....	10
2.2.4. Az <i>ex vivo</i> E/c görbék kiértékelése.....	10
2.2.5. A CPA E/c görbék NBTI okozta torzulásának kvantifikálása a régi és az új módszer szerint.....	11
2.2.6. A torzult adenzin E/c görbék hatás értékeinek korrekciója a régi és az új módszerrel.....	11
2.2.7. Adatfeldolgozás.....	11
<b>3. Eredmények.....</b>	<b>13</b>
3.1. <i>In silico</i> eredmények.....	13
3.2. <i>Ex vivo</i> eredmények.....	14
<b>5. Megbeszélés.....</b>	<b>17</b>
5.1. Az <i>in silico</i> eredmények értelmezése.....	17
5.2. Az <i>ex vivo</i> eredmények értelmezése.....	17
<b>6. Összefoglalás.....</b>	<b>20</b>
<b>8. Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>21</b>
<b>9. Közlemények.....</b>	<b>22</b>

# 1. Bevezetés

## 1.1. Célkitűzések

PhD munkám két egymásra épülő vizsgálatot foglal magában. Egy a munkacsoportunk által korábban kifejlesztett, az A<sub>1</sub> adenosin receptor (A<sub>1</sub> receptor) adenosinra vonatkozó receptor rezervjét kvalitatíve meghatározni képes módszert validáltam *in silico* (egy egyszerű, saját kidolgozású számítógépes szimulációs eljárással), majd a vizsgálat eredményei alapján megfogalmazott új hipotézisünket teszteltem *ex vivo* (egy izolált, ingerelt tengerimalac bal pitvaron végzett, klasszikus tervezésű vizsgálat során). Vizsgálataink fő célja receptor rezerv becslő módszerünk tesztelése és fejlesztése volt, de egy ezzel kapcsolatban menet közben született hipotézisünket is megvizsgáltuk.

## 1.2. Az adozinerg rendszer

A purinerg jelátvitelben szerepet játszó receptorokat két részre osztják, P1 és P2 purinoceptorokra. A P1 vagy adenosin receptor családon belül a Nemzetközi Farmakológiai Társaság (IUPHAR) négy (al)típust különböztet meg: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> és A<sub>3</sub>, melyek mind hét transzmembrán doménnel rendelkező, G-protein kapcsolt receptorok.

Az adenosin egy természetes purin-nukleozid, amelyben a nukleobázis az adenin, melyhez glikozidos kötéssel egy ribóz kapcsolódik. Az adenosin fiziológiai körülmények között folyamatosan termelődik, de koncentrációja rövid felezési ideje miatt fiziológiásan nem ér el magas szintet (emberi vérplazmában szintje 0,1-1 μM, féléletideje pedig 10 s alatti érték). A rövid felezési idő fő oka az adenosin gyors eliminációja az extracelluláris térből, amit a legtöbb sejt nukleozid transzportereinek nagy kapacitása biztosít.

Az adenosin a sejten belül főleg ATP, ADP, AMP és cAMP enzimatis bontásából keletkezik, melyeket endo-5'-nukleotidázok és egyéb alkalikus foszfatázok hajtanak végre. Keletkezhet S-adenozil-homociszteinből (SAH) is az intracelluláris S-adenozil-L-homocisztein-hidroláz enzim révén. Extracellulárisan adenosin ekto-5'-nukleotidázok működésének köszönhetően jön létre ATP-ből, ADP-ből és AMP-ből. A myocardium legfontosabb ekto-5'-nukleotidázai a CD39 és a CD73 enzim. A CD39

ADP-n keresztül AMP-t állít elő, amit a CD73 adenzinná alakít.

Az adenzin fontos jelzőmolekulája a szervezet energiaforgalmában bekövetkező változásoknak, mint az ATP metabolitja. Az adenzin által létrehozott kardioprotektív hatások főleg A<sub>1</sub> receptoron keresztül mediálódnak. A myocardialis A<sub>1</sub> receptor izgatása következtében negatív tróp (inotróp, kronotróp, dromotróp és batmotróp) hatások érvényesülnek. A pitvari A<sub>1</sub> receptor által mediált direkt (a nyugalmi kontraktilitást is csökkenteni képes) negatív inotrópia több szignalizációs útvonalon keresztül jön létre: erősödik a befelé egyenirányító K<sup>+</sup> csatornák (GIRK) megnyílása révén a kifelé irányuló K<sup>+</sup> áram, csökken az adenilcikláz enzim működése, melynek következtében gátlódik a SERCA2 és az L-típusú Ca<sup>2+</sup> csatornákon át befelé folyó Ca<sup>2+</sup> áram.

### **1.3. A<sub>1</sub> adenzin receptor ligandok**

Az A<sub>1</sub> receptorok stimulálása kiterjedt protektív és regeneratív hatásokat mediál testszerte, így az A<sub>1</sub> receptor agonisták terápiás céllal történő fejlesztése komoly lehetőségeket hordoz.

Az endogén agonista adenzin bomlékonysága nehezíti megbízható E/c görbék felvételét, ezért az A<sub>1</sub> receptorok vizsgálatára alkalmasabbak a stabilabb szintetikus agonisták. Közülük vizsgálatainkhoz a CPA-t (N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine) alkalmaztuk. A CPA szelektív A<sub>1</sub> receptor teljes (full) agonista, ami az adenzintól csak egy, az adeninhez kapcsolódó ciklopentil-csoportban különbözik. Felezési ideje az adenzinénál jóval hosszabb, mintegy 6-10 perc (patkány vérmintában mérve). Az első szelektív A<sub>1</sub> receptor antagonisták közé tartozik a reverzibilis hatású DPCPX (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine). Ebből fejlesztették ki az irreverzibilis A<sub>1</sub> receptor antagonistát FSCPX-et (8-cyclopentyl-N<sup>3</sup>-[3-(4-(fluorosulfonyl)benzoyloxy)propyl]-N<sup>1</sup>-propylxanthine). Ez utóbbi először reverzibilisen kötődik a receptorhoz, de egy időigényes folyamat során kovalens kötést alakít ki. Vizsgálatainkban az FSCPX-et úgy alkalmaztuk, hogy megfelelő mennyiségű idő álljon rendelkezésre az FSCPX irreverzibilis kötődéséhez.

#### 1.4. Az A<sub>1</sub> adenzin receptor rezerv

A receptor rezervet, melynek fogalmát a hagyományos receptorelmélet vezette be, úgy lehet megragadni, mint egy receptorális rendszer (ami receptorokból és a posztreceptorális jelátviteli elemekből áll) aktiválás utáni hatáskiváltó képességének (egy bizonyos szempontból vett) mértékét.

A receptor rezerv meghatározása azon a jelenségen alapszik, hogy a maximális(hoz közeli) hatás bizonyos esetekben a receptorok egy részének visszafordíthatatlan inaktiválása után is kiváltható marad. Minél nagyobb a receptor rezerv, annál nagyobb receptor hányadot kell inaktiválni a maximális válasz kimutatható csökkenésének elérése érdekében. A receptor rezerv tehát a receptorális rendszer „ellenállását” (vagy „tehetetlenségét”) fejezi ki egy olyan beavatkozás ellen, ami csökkenti a működőképes receptorok számát. A receptor rezervet tehát az agonista, a receptor, a szövet és a mért hatás határozza meg (pl. receptor rezerv csak full agonisták esetén tapasztalható). A receptor rezervet – multifaktoriális eredete miatt – érdemes megvizsgálni minden szóba jövő agonista, receptorális rendszer (szövet) és hatás esetében. A receptor rezerv meghatározásának leggyakoribb módja, hogy az adott agonistával irreverzibilis antagonisták hiányában és jelenlétében is felvesznek egy-egy E/c görbét, melyeket azután többféleképpen is lehet elemezni.

A receptor rezerv meglétének, illetve nagyságának ismerete hasznos egy agonista viselkedésének előrejelzéséhez egy adott szövetben kifejtendő adott hatásra nézve. Ha egy szövetben (sejttípuson) a receptor rezerv kicsi, akkor csak a nagy hatékonyságú (erős) agonisták váltanak ki komoly hatást (pl. full agonistaként viselkednek), míg a kis hatékonyságú agonisták nem képesek jelentős válasz létrehozására (parciális agonistának mutatkoznak). Másfelől, ha nagy a receptor rezerv, akkor még a kis hatékonyságú agonisták is képesek lehetnek jelentős hatást kifejteni (néha akár full agonistaként is). Ily módon kis hatékonyságú agonisták alkalmazásával biztosítható a szöveti szelektivitás abban az értelemben, hogy a hatásuk csak a nagy receptor rezervvel rendelkező szövetekben lesz erős.

Munkacsoportunknak korábban sikerült meghatározni az A<sub>1</sub> adenzinerg rendszer receptor rezervjét a pitvari direkt negatív inotrópiára nézve néhány ismertebb, stabil full agonistával. Ezt követte az előbbi receptor rezerv megbecslése az élő szövetben igen bomlékony adenzinnal is, de ehhez előbb ki kellett fejleszteni egy gyors

eliminációjú agonisták esetén is jól alkalmazható módszert. Új módszerünk tesztelésével annak megbízhatóságát kívántuk fokozni a jelen PhD munkát megalapozó vizsgálataink során.

## **1.5. Az alkalmazott matematikai modellek**

### *1.5.1. A Hill egyenlet*

A Hill egyenlet, mint a legrégebbi kvantitatív receptorműködési modell, számos receptorelmélet alapjául szolgál. A Hill egyenletet a mai napig gyakran alkalmazzák E/c görbék regresszióanalízisére.

A Hill egyenlet segítségével végrehajtott regresszióanalízis kétváltozós (c, E), háromparaméteres ( $E_{\max}$ ,  $EC_{50}$ , n) és nem lineáris (mivel nem az  $y = a \cdot x + b$  képletet követi). A Hill egyenlet a görbeillesztés szempontjából rugalmas, hiszen jelentős mérési hibával terhelt, vagy nagy biológiai variabilitást mutató E (hatás érték) adatok esetén is általában jó becslés kapható vele.

A Hill egyenletet érdemes úgy illeszteni, hogy az x tengelyen a koncentráció logaritmusát tüntetjük fel. Ennek több előnye is van. A koncentráció jellegű mennyiségek (pl.  $EC_{50}$ ) adathalmaza rendszerint nem normális eloszlású, viszont a logaritmusuk általában az (ami megkönnyíti ezek statisztikai elemzését). Emellett a szemilogaritmikus ábrázolású E/c görbék szemléletesebbek.

### *1.5.2. Az agonizmus operatív modellje*

Az agonizmus operatív modellje az agonisták receptorhoz való affinitásának és hatásgeneráló képességének kvantifikálására szolgál.

Az agonizmus operatív modellje kétváltozós (c, E), négyparaméteres ( $E_m$ ,  $K_A$ ,  $\tau$ ,  $n_{op}$ ), nem lineáris regresszióanalízis, amelyet az eredmény pontossága érdekében globálisan kell illeszteni egy natív és egy irreverzibilis antagonistával való kezelés után felvett E/c görbére (melyek esetében csak az antagonista-kezelés megléte vagy hiánya lehet a különbség). Az irreverzibilis antagonistát – amennyiben lehetséges – olyan koncentrációban kell alkalmazni, hogy számottevően csökkentse az E/c görbe maximumát a natív E/c görbééhez képest. Az irreverzibilis antagonistát alkalmazás után el kell távolítani a rendszerből az E/c görbe felvétele előtt, hogy szabad formában ne legyen jelen és ne befolyásolja az irreverzibilisen nem módosított receptorok agonista-

kötését. A natív és az antagonistával kezelt E/c görbék tehát csak a funkcióképes receptorok koncentrációjában különbözhetnek egymástól.

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

Az RRM két olyan agonista közötti interakció egyszerű matematikai modellezésén alapul, melyek (döntően vagy teljes egészében) ugyanazt a jelátviteli utat használják. A receptoriális válaszkészség módszer (receptorial responsiveness method: RRM) egy adott agonista receptorközelbeli koncentrációjának akut növekedését kvantifikálja E/c görbe felvétele révén. Egyszerű esetben akár közvetlenül is meghatározható a kérdéses agonista többlet koncentrációja. Bonyolultabb, több agonistát tartalmazó rendszereknél a meghatározni kívánt agonista többlet koncentrációját a módszer egy másik agonista ekvivalens koncentrációjával helyettesíti. Ennek nagy előnye, hogy bomlékony agonista többletének meghatározásakor a szükséges E/c görbéket ugyanazon receptor (vagy jelátviteli utak) egy másik, de stabil agonistájával vehetjük fel, ami pontosabbá teszi a becslést.

## **1.6. A disszertáció alapjául szolgáló vizsgálat előzményei**

A receptor rezerv becslésére szolgáló, saját fejlesztésű módszerünkben NBTI (S-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine) alkalmazását vezettük be a kísérleti protokollba. Az NBTI az ekvilibratív és NBTI-érzékeny nukleozid transzporter (ENT1 avagy SLC29A1) szelektív inhibitora. Mivel a fiziológiai adenzin transzport a sejtekbe irányul, az NBTI megakadályozza az E/c görbe felvétele során beadott adenzin sejtekbe irányuló transzportját és ezáltal intracelluláris eliminációját, amelynek köszönhetően az exogén adenzin számára elegendő idő áll rendelkezésre a hatás kifejtésére.

Az NBTI azonban beavatkozik a vizsgált szövet adenzin homeosztázisába is, ugyanis mérsékli az extracellulárisan keletkezett endogén adenzin intracelluláris eliminációját is. Mivel az NBTI által felhalmozott többlet endogén adenzin még a receptor rezerv meghatározásához szükséges E/c görbék felvétele előtt elhasználja az A<sub>1</sub> receptorok (és a jelátvitelük) válaszképességének egy részét (stimulálva azokat), az exogén adenzinra adott válasz (ami az E/c görbén látszik) csökkenést mutat. Ezért az NBTI jelenlétében felvett adenzin E/c görbéket (vagy legalábbis azok hatás értékeit) korrigálni kell arra a torzításra, amelyet az interstitiumbeli többlet endogén adenzin

okozott.

Ehhez a korrekcióhoz az RRM-et vettük igénybe. Az RRM-en alapuló receptor rezerv becslő módszerünk alkalmazásakor mód nyílik összehasonlítani a korrigált intakt (FSCPX-natív) és a korrigált FSCPX-kezelt adenzin E/c görbét (természetesen csak azok az E/c görbék igényelnek korrekciót, amelyeket NBTI jelenlétében vettünk fel). A kérdéses receptor rezervről a korrigált görbék végső (szaturált) részeinek egymástól való távolságából nyerhetünk információt: kis távolság nagy receptor rezervet, nagy távolság kis receptor rezervet jelent. A receptor rezerv ezen becslése kvalitatív (esetleg szemikvantitatív) tekinthető.

Elsődleges célom ezen módszer validálása volt egy *in silico* szimulációs eljárással. A szimuláció során arra törekedtünk, hogy az *in silico* E/c görbék pozíciója és lefutása az eredeti *ex vivo* E/c görbéhez minél hasonlóbb legyen. Az egyértelműség kedvéért az eredeti E/c görbékhez használt adenzint és CPA-t a szimulált görbék A és B agonistájának neveztük, míg az FSCPX-t és az NBTI-t mint irreverzibilis antagonistát (IA) és transzport inhibitor (TI) azonosítottuk (az említések sorrendjében). Az *in silico* vizsgálat során azonban – nem várt módon – interakció gyanúja merült fel az FSCPX és az NBTI (pontosabban az IA és a TI) között, amit a későbbiekben egy erre a célra megtervezett *ex vivo* vizsgálattal próbáltam kideríteni.

## 2. Anyagok és módszerek

### 2.1. *In silico* módszerek

Tengerimalac pitvar modellünkben a legfontosabb adenzin transzporter az ENT1, az interstitialis térben képződött adenzin ugyanis zömmel a nagy kapacitású ENT1 segítségével lép be a sejtekbe. Izolált, ingerelt tengerimalac bal pitvarban az NBTI által okozott ENT1 blokádnöveli az endogén adenzin interstitialis szintjét azáltal, hogy minimalizálja az adenzin influxot a cardiomyocytákba, így számottevően csökkenti az adenzin elimináció mennyiségileg legjelentősebb részét, az intracelluláris adenzin metabolizmust. Ennek megfelelően az NBTI két, egymással ellentétes irányban ható folyamat révén módosítja az adenzin E/c görbét: az endogén és az exogén adenzin eliminációjának csökkentése révén. E két (közös gyökerű) mechanizmus az adenzin E/c görbéjére kifejtett hatása szempontjából ellentétes.

A két hatás eredőjeként az NBTI valamelyest deprimálja az adenzin E/c görbe  $E_{max}$ -át és látványosan csökkenti az  $EC_{50}$  értékét (legalábbis a tengerimalac pitvari  $A_1$  receptor által közvetített direkt negatív inotrópiát mérve hatásként). Az NBTI hatása a CPA E/c görbéjére (ugyanabban a modellben) kevésbé összetett: csökkenti az  $E_{max}$ -ot és növeli az  $EC_{50}$ -et.

Függetlenül az E/c görbe kivitelezéséhez használt  $A_1$  receptor agonista mibenlététől, az NBTI által interstitialisan létrehozott endogén adenzin többlet jellegzetesen torzítja az E/c görbét, jelesül deprimálja a hatás értékeket (köztük az  $E_{max}$ -ot is) és jobbra tolja a görbét (vagyis növeli az  $EC_{50}$ -et). E torzulás mechanizmusa az, hogy a többlet endogén agonista koncentráció és annak hatása figyelmen kívül van hagyva az E/c görbe felvétele során beadott (exogén) agonista koncentrációkhoz rendelt hatásértékek meghatározása során. Amennyiben az NBTI jelenlétében kialakult E/c görbe torzulás kizárólag az NBTI ezen hatásának következtében jön létre (vagyis az NBTI az E/c görbe felvételéhez használt agonista szintjét nem befolyásolja), a torzulás mértéke alkalmas az endogén adenzin interstitialis többletének kvantifikálására.

Az *in silico* vizsgálat során az E/c görbéknek három típusát különböztettük meg: torzítatlan, torzult és korrigált. Az E/c görbe torzítatlan, ha minden agonistát figyelembe veszünk (a megfelelő koncentrációban). Az E/c görbe torzult, ha a hatás meghatározása során valamely agonista valamely koncentrációját nem vesszük figyelembe

(esetünkben: a hagyományosan kiértékelt, NBTI jelenlétében felvett E/c görbék). A torzult E/c görbe korrekciójának célja a neki megfelelő torzítatlan E/c görbe megszerkesztése.

Az egyetlen agonista hatását leíró egyenlettel létrehozott függvények az egyszerű (NBTI-mentes), torzítatlan E/c görbéket jelenítették meg, míg a két agonista együttes hatásának egyenlete volt felelős az összetett (NBTI jelenlétében felvett), de torzítatlan E/c görbék szimulációjáért (mely utóbbiakat *ex vivo* és *in vivo* nem kaphatjuk meg hagyományos kiértékeléssel). Ez utóbbi egyenletben az egyetlen koncentrációban alkalmazott agonista az NBTI által interstitialisan felhalmozott endogén adenzin többletet modellezte, míg a másik, növekvő koncentrációkban figyelembe vett agonista az E/c görbe felvételéhez használt agonistát szimulálta.

Az adenzint egy A, míg a CPA-t B elnevezésű agonistával modelleztük. Ennek megfelelően az A agonista esetében folyamatos nettó extracelluláris termelést, nettó intracelluláris eliminációt és befelé irányuló membrán transzportot tételeztünk fel. Az NBTI-t egy ún. transzport inhibitor (TI), az FSCPX-et pedig egy ún. irreverzibilis antagonistát (IA) modellezte. Az E/c görbék megszerkesztésekor a hatás értékeket mindig a szervkádbeli koncentrációkhoz rendelve ábráztuk (bomlékony agonisták esetén ugyanis *ex vivo* és *in vivo* viszonyok közepette csak ezeket ismerjük).

Első lépésként a torzítatlan E/c görbéket hoztuk létre az agonizmus operatív modelljét használva. Ennek a modellnek azt az egyenletét használtuk, ami egyetlen agonista hatását határozta meg. Így két rendszert (IA nélküli és IA melletti) és két agonistát (A, B) modelleztünk.

Második lépésként az endogén A agonista többlet és a vele együtt jelen lévő exogén A vagy B agonista által kiváltott hatást az operatív modell kiterjesztett egyenletével számoltuk ki. Az A agonista torzítatlan E/c görbéi „beépített kontrollként” is szolgáltak, amikor később összehasonlítottuk velük az A agonista korrigált E/c görbéit.

Az A agonista és a B agonista szervkádbeli koncentrációja  $10^{-10}$  és  $3,1623 \cdot 10^{-3}$  között volt. A szervkádbeli koncentrációt egyenlőnek tekintettük a receptorközeli koncentrációval a B agonista esetében (minden körülmények között), továbbá az A agonista esetén TI jelenlétében, de IA előkezelés nélkül (szimulálandó a teljes ENT1 gátlást). Az A agonista szervkádbeli koncentrációját 400-zal elosztva számoltuk ki az A

agonista receptorközeli koncentrációját TI és IA előkezelés hiányában (szimulálandó a fiziológiásan működő ENT1-et). Emellett TI jelenlétekor bevezettünk egy többlet receptorközeli koncentrációt is az endogén A agonistából.

Az IA előkezelést úgy szimuláltuk, hogy a teljes receptor koncentrációt 5-tel elosztottuk. Ily módon, korábbi FSCPX-szel szerzett eredményeinkkel összhangban azt feltételeztük, hogy az A<sub>1</sub> receptorok 20%-a maradt működőképés. Az IA és a TI együttes hatását (a jelen *in silico* vizsgálatban felvetett lehetséges interakcióját) úgy vettük figyelembe, hogy az A agonista receptorközeli koncentrációjának meghatározásához egyrészt az exogén A agonista szervkádbeli koncentrációját 3-mal elosztottuk, másrészt 3-mal osztottuk azt a többlet endogén A agonista koncentrációt is, amellyel a(z önmagában végzett) TI kezelés hatását szimuláltuk.

Harmadik lépésként a torzítatlan hatás értékeket az RRM segítségével torzítottuk, méghozzá a TI által létrehozott többlet endogén agonista által kiváltott torzító hatás és a korábban megkapott torzítatlan hatások a felhasználásával. Végül az RRM-mel a torzult hatások ismeretében ki tudtuk fejezni a többlet endogén agonistával ekvifektív B agonista koncentrációt, melyből a Hill egyenlet segítségével hatásértékeket tudunk generálni. Amikor ezt a hatást az intakt receptorpopulációjú rendszerre számoltuk ki, a B agonista intakt receptorszámú rendszerben megszerkesztett egyszerű, torzítatlan E/c görbéjének Hill paramétereit alkalmaztuk. Amikor a többlet endogén agonista által kiváltott hatást a csökkentett receptorszámú rendszerben számítottuk ki, a B agonista csökkentett receptor populációjú rendszerben létrehozott egyszerű, torzítatlan E/c görbéjének Hill paramétereit használtuk. Ezekből az RRM segítségével létrehozhatók a korrigált hatások mind az IA nélküli, mind az IA előkezelt szimulált rendszerben.

## 2.2. Anyagok és *ex vivo* módszerek

### 2.2.1. Vegyszerek és oldatok

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

Az adenzint 36°C-os módosított Krebs-Henseleit pufferben (Krebs-oldat) oldottuk fel. A CPA-t 36°C-os 1:4 (v/v) etanol:víz elegyben oldottuk. Az FSCPX és az

NBTI oldószereként dimethyl sulfoxide-ot (DMSO) használtunk. Minden törzsoldat koncentrációja 10 mM volt, kivéve azt az adenzin törzsoldatot, amelyet a 3 mM-os szervkádbeli koncentráció kialakítására alkalmaztunk (erre a célra 20 mM-os adenzin törzsoldatot használtunk, amelyet frissen készítettünk, közvetlenül a felhasználás előtt).

### 2.2.2. *Állatok és preparátumok*

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

A tengerimalacokat dekapitáltuk, majd a bal pitvarokat gyorsan eltávolítottuk és 10 mN nyugalmi feszülés mellett rögzítettük a 10 ml Krebs oldatot tartalmazó, függőleges kiképzésű szervkádakban. A bal pitvarokat platinaelektródok segítségével pontszerűen ingereltük (1 V, 3 Hz, 1 ms), melyet a felhelyezést követően azonnal megkezdtünk a programozható stimulátor és teljesítmény-erősítő segítségével. A kontrakciós erőt az izometriás összehúzódások amplitúdójával jellemeztük.

### 2.2.3. *Az ex vivo vizsgálat csoportjai és protokolljai*

A kísérlet során felhasznált pitvarokat hét csoportra osztottuk ( $n = 6-10$ ) az alkalmazott hét kísérleti protokoll szerint. A protokollok lényege, hogy felméri az adenzinra és a CPA-ra adott direkt negatív inotróp választ FSCPX előkezelés és NBTI hiányában és meglétében, beleértve az FSCPX előkezelés és az NBTI egyszerre való alkalmazását is.

### 2.2.4. *Az ex vivo E/c görbék kiértékelése*

Hatásként a pitvarok kiindulási kontrakciós erejének százalékos csökkenését definiáltuk és a beadott agonista koncentrációk függvényében ábrázoltuk.

Az E/c görbék empirikus jellemzésére a Hill egyenletet illesztettük mind az egyedi, mind átlagolt E/c görbékre. Az egyedi E/c görbék Hill paramétereit ( $E_{max}$ ,  $EC_{50}$ ,  $n$ ) statisztikai analízisre, ezáltal a csoportok összehasonlítására használtuk, míg néhány csoport esetében az átlagolt E/c görbék Hill paramétereit a torzult E/c görbék matematikai korrekciójához kellett.

### *2.2.5. A CPA E/c görbék NBTI okozta torzulásának kvantifikálása a régi és az új módszer szerint*

A többlet interstitialis adenzin szint kvantifikálására az RRM-et használtuk. Az NBTI-vel kezelt CPA csoporthoz tartozó  $c_x$  érték (az a CPA koncentráció, ami ekvifektív az NBTI által okozott endogén adenzin többlet interstitialis koncentrációjával) meghatározása része volt receptor rezerv becslő módszerünk régi és új változatának is. Az FSCPX+NBTI kezelt CPA csoporthoz kapcsolódó  $c_x$  érték (az endogén adenzin FSCPX+NBTI kezelés során kialakuló interstitialis többletének CPA egyenértéke) először az új módszer számára került meghatározásra.

### *2.2.6. A torzult adenzin E/c görbék hatás értékeinek korrekciója a régi és az új módszerrel*

Az NBTI által torzított adenzin E/c görbék hatás értékeit az NBTI által torzított CPA E/c görbékől kapott  $c_x$  értékekkel korrigáltuk mindkét módszer szerint. Először a  $c_x$ -hez tartozó hatást ( $E_x$ ) határoztuk meg a Hill egyenlet felhasználásával. Amikor az  $E_x$  értéket számítottuk az átlagolt, csak NBTI kezelt adenzin E/c görbe korrekciójához, akkor az átlagolt, csak NBTI kezelt CPA E/c görbéhez tartozó  $c_x$ -et és a kontroll CPA E/c görbe empirikus paramétereit helyettesítettük a Hill egyenletbe. A régi módszer szerint az NBTI kezelt CPA E/c görbe  $c_x$  értékével korrigáltuk az FSCPX+NBTI kezelt adenzin E/c görbét is. Az új módszer során azonban az átlagolt FSCPX+NBTI kezelt adenzin E/c görbéhez tartozó  $E_x$ -et az átlagolt FSCPX+NBTI kezelt CPA E/c görbéhez tartozó  $c_x$ -ből számoltuk és az átlagolt, csak FSCPX kezelt CPA E/c görbe empirikus paramétereit használtuk a Hill egyenlethez. A torzított hatásokból és a hozzájuk tartozó  $E_x$  értékekből azután az RRM segítségével számoltuk ki a korrigált hatásokat.

### *2.2.7. Adatfeldolgozás*

A görbék illesztéséhez használt egyenletekben a koncentrációkat tízes alapú logaritmusban fejeztük ki. Az adatok normalitását Sharpo-Wilk teszttel ellenőriztük. Két adathalmazt, ha mindkettő megfelelt a normalitás tesztnek, párosítatlan t-próbával hasonlítottunk össze. Ha bármelyik nem felelt meg, Mann-Whitney U-tesztet használtunk. Több mint két normális eloszlású adathalmazt Tukey post-teszttel kombinált egyszempontú varianciaanalízissel (one-way ANOVA, Geisser-Greenhouse korrekcióval) hasonlítottunk össze.

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

### 3. Eredmények

#### 3.1. *In silico* eredmények

Az A agonista (adenozint szimuláló) és a B agonista (CPA-t szimuláló) IA (FSCPX szimuláció) nélküli, vagyis intakt receptor populációval rendelkező rendszerben szimulált E/c görbéinek alakja és pozíciója igen hasonló volt azokhoz az adenzin és CPA E/c görbékhez, melyek FSCPX előkezelés nélküli *ex vivo* tengerimalac pitvaron lettek felvéve a munkacsoport korábbi kísérlete során.

A TI (NBTI szimuláció) kezelés az A agonista E/c görbét balra tolta és kissé csökkentette a maximális hatást, csakúgy, mint ahogy azt a 10  $\mu\text{mol/L}$  NBTI kezelés tette az adenzin E/c görbével a biológiai rendszerben. Mivel a szimuláció során több tényezőt kellett harmonizálni, ez a hatás valamivel kisebb volt a szimulált modellben, mint a biológiai rendszerben. A 10  $\mu\text{mol/L}$  FSCPX és 10  $\mu\text{mol/L}$  NBTI együttes alkalmazásának meglepő hatása az adenzin E/c görbére (vagyis az, hogy ENT1 blokáddal mellett az irreverzibilis A<sub>1</sub> receptor antagonisták fokozta az adenzin maximális hatását) azonban nem volt *in silico* reprodukálható azzal a feltételezéssel, hogy a TI az IA előkezeléstől függetlenül hat. Ezzel szemben, amikor interakciót feltételeztünk az IA és a TI között, a három E/c görbe relatív helyzetét sikerült a biológiai rendszerben láthatóhoz hasonlóvá tenni. Ezen vizsgálat során azt feltételeztük, hogy az előzetes IA előkezelés gátolta a TI hatását.

A TI kezelés balra tolta a B agonista E/c görbét és mérsékelten csökkentette annak maximális hatását, összehasonlítva a B agonista egyszerű, torzítatlan és IA nélküli E/c görbéjével (amely a kontroll görbét képviseli). Ez megfelel az *ex vivo* CPA E/c görbék viselkedésének, melyeket 10  $\mu\text{mol/L}$  NBTI hiányában, illetve jelenlétében vettünk fel. Az RRM becslése a transzportgátlás miatti többlet A agonista koncentrációra egyébként majdnem megegyezett a szimulációban előre meghatározott értékkel ( $3.86 \cdot 10^{-7}$  és  $4 \cdot 10^{-7}$ ).

A transzportgátlás hatására fellépő agonista akkumuláció torzító hatásának korrekcióját követően az E/c görbék ugyanazt az elrendeződést mutatták az *in silico* és az *ex vivo* rendszerekben. Az A agonista telítő koncentrációjánál a csak TI-vel kezelt E/c görbe hatás értékei meghaladták az IA-val és TI-vel egyaránt kezelt E/c görbe hatás értékeit, igaz, nem sokkal, a görbék hatás értékei szinte azonosak voltak. Ez az eredmény

megerősíti azon korábbi vizsgálataink eredményeit, amelyek szerint az adenzin direkt negatív inotróp hatására vonatkozó  $A_1$  receptor rezerv igen nagy tengerimalac pitvarban.

Az A agonista korrigált TI kezelt (és IA előkezelés nélküli) E/c görbéje a várakozásoknak megfelelően gyakorlatilag átfedett a neki megfelelő torzítatlan E/c görbével (amely a korrekció beépített kontrolljaként szolgált). Ezzel szemben a korrigált IA előkezelt és TI kezelt E/c görbe jelentősen meghaladta a torzítatlan párját (a beépített kontrollt) az A agonista kis és közepes koncentrációinál, melynek oka az IA és a TI között modellezett interferencia.

### 3.2. *Ex vivo* eredmények

Az exogén adenzin koncentrációfüggően csökkentette az összes pitvar kontrakciós erejét. Az első adenzin E/c görbék Hill paraméterei nem mutattak szignifikáns különbségeket a kísérleti csoportok között. Ez a megfigyelés a vizsgálathoz használt pitvarok homogenitását mutatja.

Korábbi megfigyeléseinkkel összhangban az NBTI kezelés a CPA E/c görbét jelentősen deprimálta (csökkentve a  $E_{max}$ -ot) és jobbra tolta (növelve a  $\log EC_{50}$ -et) a kontroll CPA E/c görbével összehasonlítva. Korábbi megfigyeléseinkkel szintén összhangban az FSCPX előkezelés a CPA E/c görbét mérsékelten jobbra tolta a kontroll CPA E/c görbéhez képest (növelve a  $\log EC_{50}$ -et). Az FSCPX és az NBTI együttes alkalmazása ugyanakkor a CPA E/c görbe lefutásán a kizárólag FSCPX-szel előkezelt CPA E/c görbéhez képest szinte semmit nem változtatott, eltekintve a maximális hatás és a Hill koefficiens enyhe, nem szignifikáns csökkentésétől. Ez azt jelenti, hogy az FSCPX előkezelés szinte teljesen felfüggesztette az NBTI hatását a CPA-ra adott válaszra.

Az NBTI hatására felhalmozódott többlet interstitialis adenzin 100,2 nM CPA-val, míg az FSCPX és NBTI együttes kezelés hatására felszaporodó többlet interstitialis adenzin csak 6,73 nM CPA-val bizonyult ekviekvívnek. Így az FSCPX előkezelés az NBTI által felhalmozott extra interstitialis adenzin koncentrációját kevesebb, mint egytizedre csökkentette az izolált tengerimalac pitvarban.

Ahogy az várható volt az NBTI szignifikánsan deprimálta és balra tolta az adenzin E/c görbét a kontrollhoz képest (bár a maximális hatás csökkenése nagyobb volt, mint korábban). A várakozásoknak megfelelően az FSCPX előkezelés pedig jobbra

tolta az adenzin E/c görbét a kontrollhoz képest, nagyjából annyira, mint a CPA E/c görbe esetében. Az FSCPX+NBTI kezelés ugyanakkor olyan adenzin E/c görbét hozott létre, melynek  $E_{max}$  értéke gyakorlatilag megegyezett a kontroll (valamint a kizárólag FSCPX előkezelt) adenzin E/c görbe  $E_{max}$ -ával,  $logEC_{50}$  értéke viszont hasonló volt a kizárólag NBTI kezelt adenzin E/c görbe  $logEC_{50}$ -ével. Az FSCPX előkezelés tehát gátolni látszik az NBTI néhány, de nem minden hatását az adenzinra adott válasza.

A jelen vizsgálatban ezen interferencia mértéke szokatlanul nagy volt (csakúgy, ahogy az NBTI deprimáló hatása is igen kifejezett volt a korábbi tapasztalatokhoz képest). Az FSCPX előkezelés szignifikánsan növelte a CPA-ra és az adenzinra adott választ is, nemcsak magas koncentrációkban, hanem közepes koncentrációkban is, amikor az FSCPX-NBTI kezelt E/c görbét a kizárólag NBTI kezelt görbékkel hasonlítottuk össze. Az FSCPX előkezelés ugyanakkor nem befolyásolta szignifikánsan az NBTI erőteljes balra toló hatását az adenzin E/c görbére. Ennek eredményeként az FSCPX-NBTI kezelt és a csak FSCPX előkezelt CPA E/c görbe alig különülnek el, míg az FSCPX-NBTI kezelt és a csak FSCPX előkezelt adenzin E/c görbe egymástól a lehető legtávolabb helyezkednek el.

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

A korrigált, csak NBTI kezelt adenzin E/c görbe jelentősen meghaladta korrigálatlan (hagyományosan értékelt) párját. A korrigált, csak NBTI kezelt adenzin E/c görbe maximuma elérte kontrolljának maximumát. A korrigált, csak NBTI kezelt adenzin E/c görbe kiindulási pontja az a hatás volt, amit az NBTI miatt felszaporodó interstitialis adenzin önmagában váltott ki intakt (FSCPX nélküli)  $A_1$  receptor

készleten. Az új módszer alkalmazásakor a korigált FSCPX-NBTI kezelt adenzin E/c görbe mélyen a korigált, csak NBTI kezelt adenzin E/c görbe alatt kezdődött, de gyakorlatilag ugyanazt a maximumot érte el, mint a kontroll görbe és a korigált, csak NBTI kezelt adenzin E/c görbe. Korábbi megállapításunknak megfelelően ez is azt bizonyítja, hogy az A<sub>1</sub> receptor rezerv igen nagy az adenzin direkt negatív inotróp hatására nézve tengerimalac pitvaron. Ez azt mutatja, hogy a régi módszerrel kapott eredmények túlbecsülik a kérdéses receptor rezervet, de csak kismértékben.

## 5. Megbeszélés

### 5.1. Az *in silico* eredmények értelmezése

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

*In silico* vizsgálatunk tehát megerősítette, hogy – a korábban ismertetett eredményekkel összhangban – a tengerimalac bal pitvari A<sub>1</sub> receptorok rezervje az adenzin direkt negatív inotróp hatására nézve továbbra is nagynak tekinthető. Ezenkívül a szimulációs eljárás megbízható módszerként validálta az általunk használt receptor rezerv becslő módszert, noha felvetette annak egy továbbfejlesztési lehetőségét.

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

### 5.2. Az *ex vivo* eredmények értelmezése

A jelen értekezést megalapozó *ex vivo* vizsgálatunk fő megállapítása, hogy az FSCPX (irreverzibilis A<sub>1</sub> receptor antagonist) előkezelés szelektíven befolyásolja az NBTI (ENT1 inhibitor) egyes hatásait az adenzin és a CPA (A<sub>1</sub> receptor agonisták) E/c

görbéire izolált, ingerelt tengerimalac bal pitvaron. Míg az FSCPX előkezelés erőteljesen gátolja az NBTI depresszív ( $E_{\max}$  csökkentő) hatását mind az adozin, mind a CPA esetében, nem érinti lényegesen az NBTI hatását az adozin E/c görbe  $EC_{50}$  értékére. Ennek megfelelően az ezt megelőző *in silico* vizsgálat azon megállapítását, miszerint az FSCPX előkezelés úgy általánosságban gátolja az NBTI hatását, az új *ex vivo* eredmények fényében finomítani kell. Úgy tűnik, hogy az FSCPX előkezelés mérsékli az NBTI hatását az endogén adozin interstitialis szintjére, de nem befolyásolja az NBTI hatását az exogén adozin interstitialis koncentrációjára. Az FSCPX célpontja tehát (az  $A_1$  receptor mellett) nem lehet az ENT1 transzporter vagy bármely más olyan molekula, amely részt vesz az NBTI exogén adozin szintre gyakorolt hatásának közvetítésében. A kérdéses extra célpont inkább egy (vagy néhány) olyan molekula lehet, amely kizárólag az NBTI endogén adozin koncentrációra kifejett hatásával van kapcsolatban. Ilyen(ek) lehet(nek) az interstitialis adozin termelésében részt vevő enzim(ek).

Ha az FSCPX csak egyszerű irreverzibilis  $A_1$  antagonistá lenne, akkor az NBTI kezelt CPA E/c görbén csak jobbra tolódást eredményezne (növelve annak az  $EC_{50}$  értékét). Amikor az FSCPX+NBTI kezelést alkalmaztuk az adozin E/c görbe esetében, az NBTI  $E_{\max}$  csökkentő hatása megszűnt, míg az NBTI  $EC_{50}$  csökkentő hatása gyakorlatilag változatlan maradt. Az E/c görbék ezen viselkedése ellentmond annak az általános vélekedésnek, hogy az FSCPX csak irreverzibilis  $A_1$  receptor antagonistaként fejt ki hatását.

Az FSCPX ( $A_1$  receptoron kívüli) célpontjának egy olyan molekulának kell lennie, amely az NBTI endogén adozin szintet növelő hatásával áll kapcsolatban. Azok az enzimek az elsődleges jelöltek, amelyek részt vesznek az interstitialis adozin képződésében. Reálisan feltételezhető, hogy az FSCPX, amely kapcsolódni tud az adozin kötőhelyéhez az  $A_1$  receptoron, ugyanezt meg tudja tenni egy (vagy több) enzim adozin kötőhelyén is. Ha valóban ez a helyzet, az FSCPX előkezelés tartósan csökkenti az interstitialis adozin szintet. Mivel a nyugalmi interstitialis adozin koncentráció észrevehetetlenül kis negatív inotróp hatást vált csak ki tengerimalac pitvarban, annak FSCPX okozta csökkenése önmagában szintén nem észrevehető (a negatív inotrópia vizsgálatával). Ha azonban FSCPX előkezelés eredményeként kisebb az interstitialis adozin-termelő képesség, az NBTI lényegesen kevésbé képes megemlíni az endogén adozin interstitialis szintjét, mint ép interstitialis adozin

termelés mellett. Az interstitialis adenzin szint kisebb növekedése (az E/c görbe felvétele előtt) látványos változásokat idézhet elő mind az adenzin, mind a CPA E/c görbéin (az  $E_{max}$  kevésbé csökken, az  $EC_{50}$  pedig kevésbé nő).

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

## 6. Összefoglalás

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

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

## 8. Köszönetnyilvánítás

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

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

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

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

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

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

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



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

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

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Erdei, T. D.**, Szabó, A. M., Lampé, N., Szabó, K., Kiss, R., Zsuga, J., Papp, C., Pintér, Á., 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
2. Zsuga, J., **Erdei, T. D.**, Szabó, K., Lampé, N., Papp, C., Pintér, Á., Szentmiklósi, J. A., Juhász, B., Szilvássy, Z., Gesztelyi, R.: Methodical Challenges and a Possible Resolution in the Assessment of Receptor Reserve for Adenosine, an Agonist with Short Half-Life. *Molecules*. 22 (5), 1-17, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules22050839>  
IF: 3.098

### További közlemények

3. Lampé, N., Priksz, D., **Erdei, T. D.**, Bombicz, M., Kiss, R., Varga, B., Zsuga, J., Szerafin, T., Csanádi, Z., Balla, G., Balla, J., Szilvássy, Z., Gesztelyi, R., Juhász, B.: Negative Inotropic Effect of BGP-15 on the Human Right Atrial Myocardium. *J. Clin. Med.* 9 (5), 1-18, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm9051434>  
IF: 3.303 (2019)
4. Szabó, A. M., Viczján, G., **Erdei, T. D.**, Simon, I., Kiss, R., 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: 4.556





5. Szabó, A. M., **Erdei, T. D.**, Viczján, G., Kiss, R., Zsuga, J., Papp, C., Pintér, Á., Juhász, B., Szilvássy, Z., Gesztelyi, R.: An Advanced in silico Modelling of the Interaction between FSCPX, an Irreversible A1 Adenosine Receptor Antagonist, and NBTI, a Nucleoside Transport Inhibitor, in the Guinea Pig Atrium.  
*Molecules*. 24 (12), 1-16, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24122207>  
IF: 3.267
6. Zsuga, J., Móré, E. C., **Erdei, T. D.**, Papp, C., Kolozsváriné Harsányi, S., Gesztelyi, R.: Blind spot for sedentarism: redefining the disease of physical inactivity in view of circadian system and the irisin/BDNF axis.  
*Front. Neurol.* 9, 1-13, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2018.00818>  
IF: 2.635
7. Kemény-Beke, Á., Bodnár, B., **Erdei, T. D.**, Gesztelyi, R., Ujhelyi, Z., Bácskay, I.: Szempontok a megfelelő műkönyncsepp kiválasztásához a száraz szem betegség kezelésében.  
*Gyógyszerészet*. 62, 722-725, 2018.
8. Papp, C., Pák, K., **Erdei, T. D.**, Juhász, B., Seres, I., Szentpéteri, A., Kardos, L., Szilasi, M., Gesztelyi, R., Zsuga, J.: Alteration of the irisin-brain-derived neurotrophic factor axis contributes to disturbance of mood in COPD patients.  
*Int. J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* 12, 2023-2033, 2017.  
IF: 2.917
9. Tajti, G., Pák, K., Képes, Z., **Erdei, T. D.**, Fodor, A., Mikáczó, A., Zsuga, J., Szilasi, M., Gesztelyi, R.: Asthma bronchiale-val kezelt betegek inzulinérzékeny és inzulinrezisztens-csoportjainak összehasonlítása.  
*Med. Thorac.* 68 (3), 193-199, 2015.
10. Pák, K., Zsuga, J., Képes, Z., **Erdei, T. D.**, Varga, B., Juhász, B., Szentmiklósi, J. A., Gesztelyi, R.: The effect of adenosine deaminase inhibition on the A1 adenosinergic and M2 muscarinergic control of contractility in eu- and hyperthyroid guinea pig atria.  
*Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 388 (8), 853-868, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-015-1121-6>  
IF: 2.376





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

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

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

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

Debrecen, 2021.03.01.

