

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Viczján Gábor

**A receptoriális válaszkészség módszer (RRM)
felhasználása a pitvari adenozinerg rendszert
befolyásoló farmakonok vizsgálatára**

DEBRECENI EGYETEM
TÁPLÁLKOZÁS- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2023.

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A receptoriális válaszkészség módszer (RRM)
felhasználása a pitvari adenozinerg rendszert
befolyásoló farmakonok vizsgálatára**

Viczján Gábor

TÉMAVEZETŐ: Dr. Gesztelyi Rudolf



DEBRECENI EGYETEM
TÁPLÁLKOZÁS- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2023.

Experiments are the only means of knowledge at our disposal. The rest is poetry, imagination.

Max Planck

Tartalomjegyzék

| | |
|--|-----------|
| 1. Rövidítések | 1 |
| 2. Bevezetés és célkitűzések | 3 |
| 2.1. A purinerg transzmisszió..... | 3 |
| 2.2. Adenozin, adenozin analógok, receptorok..... | 4 |
| 2.3. Az adenozin transzport gátlók és az FSCPX hatása az A ₁ adenozin receptor agonisták E/c görbéire | 7 |
| 2.4. A kannabidiol és az adenozinerg rendszer kapcsolata | 12 |
| 3. Anyagok és módszerek | 17 |
| 3.1. Az FSCPX vizsgálatával kapcsolatos módszerek..... | 17 |
| 3.1.1. <i>In vitro</i> CD39 és CD73 Inhibitor Screening Assay Kit mérések..... | 17 |
| 3.1.1.1. Vegyszerek és oldatok | 17 |
| 3.1.1.2. Protokoll | 17 |
| 3.1.2. <i>Ex vivo</i> funkcionális vizsgálatok..... | 18 |
| 3.1.2.1. Vegyszerek és oldatok | 18 |
| 3.1.2.2. Állatok és csoportok..... | 18 |
| 3.1.2.3. Protokollok | 20 |
| 3.1.2.4. Az E/c görbék kiértékelése | 22 |
| 3.2. CBD-vel kapcsolatos módszerek..... | 22 |
| 3.2.1. Vegyszerek és oldatok | 22 |
| 3.2.2. Állatmodellek és kísérleti csoportok | 23 |
| 3.2.3. <i>Ex vivo</i> funkcionális vizsgálatok és a protokollok | 24 |
| 3.2.4. Az E/c görbék korrekciója..... | 24 |
| 3.2.5. E/c görbék empirikus jellemzése..... | 25 |
| 3.2.6. Az átlagolt CPA E/c görbék CBD okozta torzulásának kvantifikálása | 25 |
| 3.2.7. Az átlagolt CPA és adenozin E/c görbék CBD által torzított hatás értékeinek korrekciója | 26 |
| 3.3. Adatelemzés..... | 27 |
| 4. Eredmények | 28 |
| 4.1. FSCPX-szel kapcsolatos eredmények | 28 |
| 4.1.1. CD39 és CD73 inhibitor esszék..... | 28 |
| 4.1.2. Az FSCPX és az NBMPR közötti interakció patkány bal pitvaron | 29 |
| 4.1.2.1. Az adenozinra adott válasz az <i>in vitro</i> kezelések előtt | 29 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1.2.2. A CHA-ra adott válasz a kontroll csoportokban..... | 29 |
| 4.1.2.3. A CHA-ra adott válasz a különböző in vitro kezelések után | 30 |
| <i>4.1.3. A PSB-12379 kölcsönhatása az NBTI-vel tengerimalac bal pitvarban.....</i> | <i>31</i> |
| 4.1.3.1. Az adenosinra adott válasz minden csoportban | 31 |
| 4.1.3.2. A CPA-ra adott válaszok a "CPA-hoz" jelzéssel ellátott csoportokban..... | 33 |
| 4.1.3.3. Az adenosinra adott válasz az "Ado-hoz" jelzéssel ellátott csoportokban..... | 33 |
| <i>4.1.4. Az adagolás befolyása az FSCPX-előkezelés hatására a bal pitvarokon.....</i> | <i>35</i> |
| 4.1.4.1. Az adenosinra adott válasz az in vitro kezelések előtt | 35 |
| 4.1.4.2. A CPA-ra adott válasz 10 µM FSCPX-szel történő in vitro előkezelést követően, különböző adagolási sémák alkalmazása mellett | 36 |
| 4.2. A CBD-vel kapcsolatos eredmények | 38 |
| 4.2.1. A CPA-ra és az adenosinra adott válasz | 38 |
| 4.2.2. A CBD által termelt interstitialis adenosin többlet | 39 |
| 4.2.3. A CPA és az adenosin E/c görbék korrigált hatásai CBD-kezelt patkány pitvaron... | 41 |
| 5. Megbeszélés..... | 43 |
| 5.1. Az FSCPX-re vonatkozó következtetéseink..... | 43 |
| 5.2. A CBD-re vonatkozó következtetéseink..... | 47 |
| 6. Az új eredmények összefoglalása | 53 |
| 7. Summary of the findings..... | 54 |
| 8. Irodalom..... | 55 |
| 8.1. A disszertáció elkészítéséhez felhasznált irodalom | 55 |
| 8.2. A disszertációt megalapozó közlemények igazolása | 65 |
| 9. Tárgyszavak..... | 67 |
| 10. Köszönetnyilvánítás | 68 |
| 11. Függelék..... | 69 |

1. Rövidítések

5-HT: 5-hidroxi-triptamin (szerotonin)

AC: adenilát-cikláz

ADA: adenzin dezamináz

ADP: adenzin-difoszfát

AEA: anandamid

AMP: adenzin-monofoszfát

ANOVA: varianciaanalízis

APP: amiloid prekursor protein

ATP: adenzin-trifoszfát

CBD: kannabidiol

CB receptor: kannabinoid receptor

CD39: ekto-apiráz

CD73: ekto-5'-nukleotidáz

CHA: *N*⁶-cyclohexyladenosine

CPA: *N*⁶-cyclopentyladenosine

DM: diabétesz mellitusz

DMSO: dimetil-szulfoxid

E/c: koncentráció-hatás

EC₅₀: maximális hatás feléhez tartozó agonista koncentráció

EFGR: epidermális növekedési faktor receptor

E_{max}: maximális hatás

ENT1 (avagy SLC29A1): nitrobenziltioinozin-érzékeny ekvibratív nukleozid transzporter

E-NTPDáz: ektonukleotidáz

FAAH: zsírsav-amid-hidroláz

FSCPX: 8-cyclopentyl-*N*³-[3-(4-(fluorosulfonyl)benzoyloxy)propyl]-*N*¹-propylxanthine

GFAP: gliafibrilláris savas fehérje

HPA tengely: hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely

IL-1 β : interleukin-1 béta

iNOS: indukálható nitrogén-monoxid-szintáz

NBMPR: *S*-(4-nitrobenzyl)-6-thioinosine

NBTI: *S*-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine

NF- κ B: nukleáris faktor-kappa B
NK sejt: természetes ölósejt (natural killer sejt)
NO: nitrogén-monoxid
NOD egér: non-obese diabetes-prone egér
PLC: foszfolipáz-C
POM-1: nátrium-polioxometallát
PPAR γ : peroxiszóma proliferátor aktivált receptor- γ
PSB-12379: dinátrium *N*⁶-benzyl- α,β -methylenadenosine-5'-diphosphate
RRM: receptoriális válaszkészség módszer (receptorial responsiveness method)
SD: standard deviáció
SEM: az átlag standard hibája (standard error of the mean)
THC: Δ^9 -tetrahydrokannabinol
TNF- α : tumornekrózis faktor- α
UDP: uridin-difoszfát
UTP: uridin-trifoszfát
ZDF: Zucker Diabetic Fatty

2. Bevezetés és célkitűzések

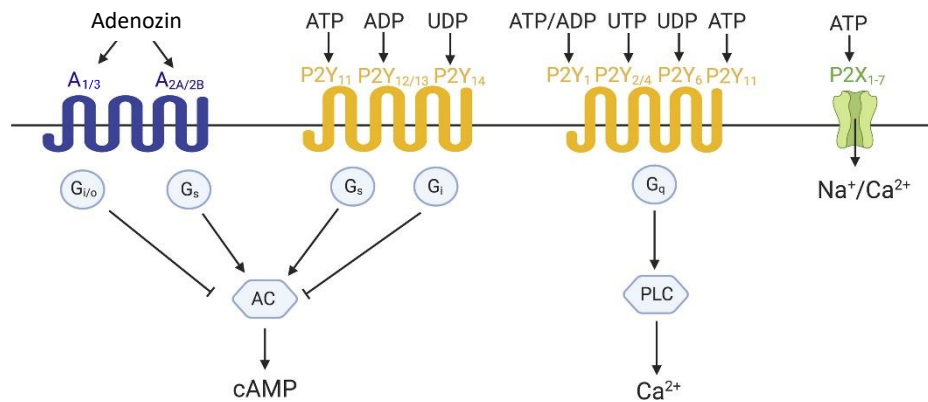
2.1. A purinerg transzmisszió

A purinerg receptorokat, melyek kezdetben egy családot alkottak, jelenleg kétfelé oszthatjuk, P1 (P1R) és P2 (P2R) csoportra. A P1 avagy adenzin receptorok családján belül 4 (al)típust különböztetünk meg: A₁R, A_{2A}R, A_{2B}R, A₃R. A P2 receptorok 2 családra oszthatók: az ionotróp P2X és a metabotróp P2Y. A P2X családon belül 7 receptor típust (P2X₁₋₇R), a P2Y családon belül pedig 8 receptor típust (P2Y₁R, P2Y₂R, P2Y₄R, P2Y₆R, P2Y₁₁R, P2Y₁₂R, P2Y₁₃R, P2Y₁₄R) különítették el. A P1 receptorok endogén ligandja az adenzin (ezért ez adja a család jelenleg hivatalos nevét), a P2 receptorokat viszont számos nukleotid (és foszfátjaik) képesek aktiválni. A P2X₁₋₇ receptorok, a P2Y₂R és a P2Y₁₁R főleg ATP-vel stimulálhatók, a P2Y₁, P2Y₁₂ és P2Y₁₃ receptorok inkább ADP-vel, míg a P2Y₁R mindkettővel. A P2Y₂R és a P2Y₄R agonistája az UTP, a P2Y₆R és a P2Y₁₄R pedig UDP-re érzékeny. A purinerg jelátvitel számos élettani folyamatban vesz részt, mint például a sejtproliferáció, angiogenezis, vérlemezke aggregáció, immunválasz, valamint az értónus szabályozása. Számos tanulmány szerint a purinerg jelátvitel megváltozhat különböző cardiovascularis betegségekben, köztük atherosclerosisban, ischaemiás szívbetegségben, hypertensióban, pulmonális hypertensióban és diabéteszben, ami hozzájárul a cardiovascularis diszfunkció, vascularis remodelling, kóros érpermeabilitás és gyulladás patomechanizmusához (Zhou és mtsai, 2020) (1. ábra).

Az adenzin receptorok mindegyike, továbbá sok P2 receptor is (P2X₁R, P2X₂R, P2X₃R, P2X₄R, P2X₇R, P2Y₁R, P2Y₂R, P2Y₄R, P2Y₆R, P2Y₁₁R és P2Y₁₂R) ubikviter expressziójúak a cardiovascularis rendszerben és fontos szabályozó funkciójuk van. Mind a négy adenzin receptor expresszálódik a cardiomyocytákban, az endotéliumban és a vascularis simaizomsejtekben is (Burnstock és mtsai, 2017).

Az A₁R és az A₃R gátló módon kapcsolódik az adenilát-cikláshoz a G_{i/o} fehérje α -alegységén keresztül, így ezen receptorok aktivációja a cAMP szint csökkenésében nyilvánul meg. Az A_{2A}R és A_{2B}R serkentő jellegűen kapcsolódik az adenilát-cikláshoz G_s révén, így ezek aktivációja növeli a cAMP szintjét. Az A₁R negatív tróp hatásokat közvetít a szívben, ezzel a β -adrenerg hatások ellen dolgozva. Az A_{2A}R aktiváció indirekte fokozza a szívizom kontraktilitását az A₁R-mediált antiadrenerg hatások gátlása révén, míg az A_{2B}R direkt pozitív inotróp hatást közvetít anélkül, hogy hatna a β -adrenerg vagy A₁R-mediálta antiadrenerg

folyamatokra. Az A₃R stimulálása erősít egyes A₁R-mediálta kardioprotektív hatásokat, de cardiomyocytá apoptózist is indukálhat (Wernly és Zhou, 2020).



1. ábra. A purinerg transzmisszió. A_{1/3}, A_{2A/2B}: A₁, A₃, A_{2A}, A_{2B} (al)típusú adenoszin receptorok; AC: adenilát-cikláz; cAMP: ciklikus adenoszin-monofoszfát; G_i/G_{i/o}: adenilát-cikláz gátló G-fehérje; G_q: foszfolipáz-C aktiváló G-fehérje; G_s: adenilát-cikláz stimuláló G-fehérje; P2X₁₋₇: P2X₁₋₇ P2 receptorok; P2Y_{1/2/4/6/11/12/13/14}: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄ P2 receptorok; PLC: foszfolipáz-C; ADP: adenoszin-difoszfát; ATP: adenoszin-trifoszfát; UDP: uridin-difoszfát; UTP: uridin-trifoszfát (Wernly és Zhou, 2020, alapján)

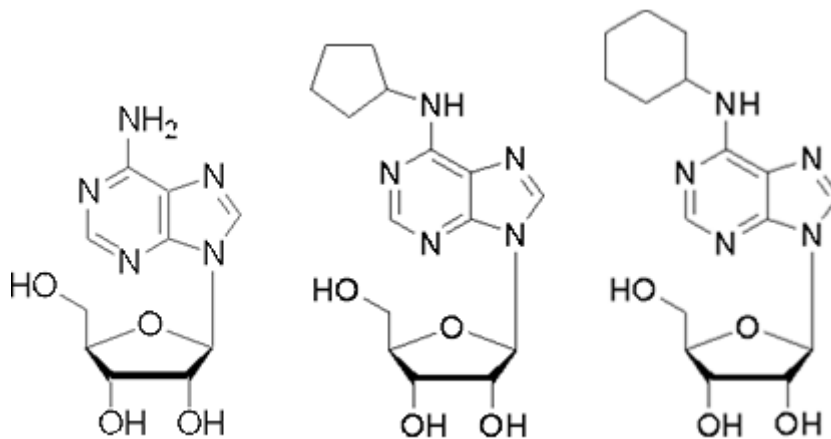
2.2. Adenoszin, adenoszin analógok, receptorok

Az adenoszin purin nukleozid, ami adeninből és ribózból áll. Különleges szerepet játszik a nukleinsav metabolizmusban azáltal, hogy a szervezetben számos fiziológiás és kóros folyamatot befolyásol. Az adenoszin ugyanis nem csak számos enzim és transzporter szubsztrátja, hanem az adenoszin receptorok fő agonistája is (Fredholm és mtsai, 2001, Fredholm és mtsai, 2011). *In vivo* féléletideje igen kicsi (<1 s) (Borea és mtsai, 2018).

Az adenoszin receptorok (A₁, A_{2A}, A_{2B} és A₃) 7 transzmembrán doménnel rendelkező, G-fehérje kapcsolt receptorok: (Adriaan és mtsai, 2022). Vizsgálataink középpontjában az A₁ adenoszin receptor (a továbbiakban: A₁ receptor) állt, melynek stimulálása testszerte protektív és regeneratív folyamatokat indít el (Fredholm és mtsai, 2001; Szentmiklósi és mtsai, 2011; Headrick és mtsai, 2013; Lasley, 2018). Ez a szívizom domináns adenoszin receptor-típusa, amely számos energiaigény-csökkentő folyamatot indít el, beleértve a negatív tróp hatásokat, elsősorban a supraventricularis szívizmon (Fredholm és mtsai 2001; Belardinelli és mtsai, 1995, Headrick és mtsai, 2013; Ines és mtsai, 2023). A supraventricularis szívizomban az adenoszin képes a kontrakciós erőt a nyugalmi szint alá is csökkenteni (direkt negatív inotróp hatás) (Fredholm és mtsai, 2001; Belardinelli és mtsai, 1995). Ennek megfelelően az izolált, ingerelt

bal pitvarban a direkt (azaz a kontrakciós erő előzetes fokozása nélküli) negatív inotróp hatás az A₁ receptor működésének jól mérhető és megbízható kimeneti változójaként szolgálhat (Belardinelli és mtsai, 2015; Fredholm és mtsai, 2001; Gesztelyi és mtsai, 2013).

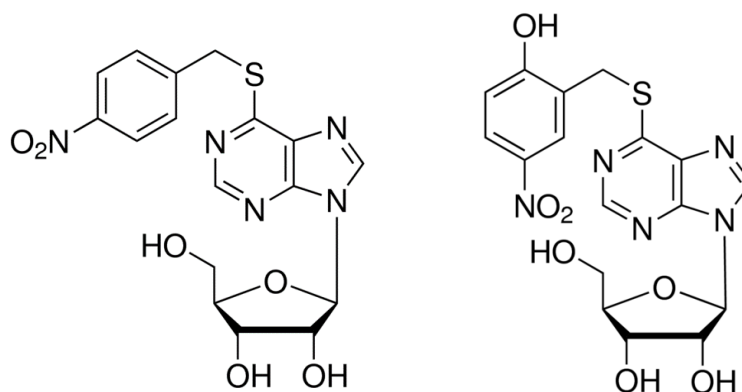
A CPA (*N*⁶-cyclopentyladenosine) és a CHA (*N*⁶-cyclohexyladenosine) szintetikus adenosin analógok, amelyek szelektív, biológiailag stabil (enzimrezisztens, különösen a CHA [Pavan és mtsai, 1998]), ENT1-en (nitrobenziltioinozin-érzékeny ekvilibratív nukleozid transzporter) keresztül kismértékben transzportálódó és nagy hatékonyságú (különösen a CPA (Gesztelyi és mtsai, 2013) teljes agonistái az A₁ receptornak (2. ábra).



2. ábra. Az adenosin, a CPA és a CHA szerkezete (balról jobbra)

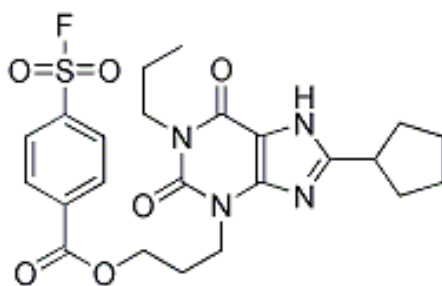
Az ENT1 (más néven SLC29A1), a szív egyik fő ekvilibratív adenosin transzportere (Thorn és mtsai, 1996; Dekanski és mtsai, 2004; Boswell-Casteel és mtsai, 2017), befolyásolja a különböző nukleozidok és exogén nukleozid analógok eloszlását és szintjét (Deussen és mtsai, 1999, 2006; Choi és mtsai, 2012; Boswell-Casteel és Hays, 2017). Az adenosin gyorsan metabolizálódó szubsztrát, amelynek nettó képződése az interstitiumban, nettó eliminációja pedig a sejteken belül történik (Deussen és mtsai, 1999, 2006). A passzív adenosin transzport tehát a sejtekbe irányul (például az endotéliumba és a szívizomsejtekbe), így az ENT1 gátlása növeli az interstitialis adenosin koncentrációját (Deussen és mtsai, 1999, 2006; Karsai és mtsai, 2006). Az ENT1-en keresztüli adenosin-transzport jelentősége az interstitialis adenosin szint szabályozásában (és ezáltal az adenosin által kiváltott védőfolyamatokban) - hosszú távú ischaemia során - az ENT1 csökkent expressziójában és aktivitásában tükröződik (Choi és mtsai, 2012; Boswell-Casteel és Hays, 2017). Az ennek következtében megemelkedett interstitialis adenosin koncentráció fokozza az adozinerg jelátvitelt az adenosin receptorok ortoszterikus kötőhelyének sejtfelszíni lokalizációja miatt (Fredholm és mtsai, 2001).

A nitrobenziltioinozin származékok (pl. NBMPR és NBTI, lásd: 3. ábra) olyan adenosin analógok, amelyek az ENT1 szelektív inhibitorai. A nitrobenziltioinozinok jelentős mértékben képesek módosítani a sejtmembránt áthidaló ENT1 által szállított molekulák szöveti eloszlását, főleg, ha ez utóbbiak keletkezése és elbomlása nem hasonló a sejtmembrán által elválasztott két kompartmentben. Az adenosinra nettó extracelluláris keletkezés és intracelluláris elimináció jellemző, ami befelé irányuló transzportot tart fenn az adenosinra nézve. Ebből következően az ENT1 gátlása növeli az extracelluláris adenosin koncentrációt. Mivel az adenosin a sejtekben nagyrészt ATP-vé épül, a fennmaradó mennyiség pedig döntően S-adenozil-homocisztein formában raktározódik, az intracelluláris szabad adenosin koncentráció (energetikailag intakt sejtekben) mindenképpen alacsony lesz (Deussen és mtsai, 1999, 2006).



3. ábra. Az NBMPR [*S*-(4-nitrobenzyl)-6-thioinosine] (balra) és az NBTI [*S*-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine] (jobbra) szerkezete

Az FSCPX (4. ábra) is adenosin analóg, melyet szelektív, irreverzibilis A_1 receptor antagonistaként ismernek (Lorenzen és mtsai, 2002; Scammells és mtsai, 1994; Srinivas és mtsai, 1996; Gesztelyi és mtsai, 2013). Lipidoldékony, vízben gyorsan bomlik (van Muijlwijk-Koezen és mtsai, 2001).



4. ábra. Az FSCPX (8-cyclopentyl- N^3 -[3-(4-(fluorosulfonyl)benzoyloxy)propyl]- N^1 -propylxanthine) szerkezete

2.3. Az adenosin transzport gátlók és az FSCPX hatása az A₁ adenosin receptor agonisták E/c görbéire

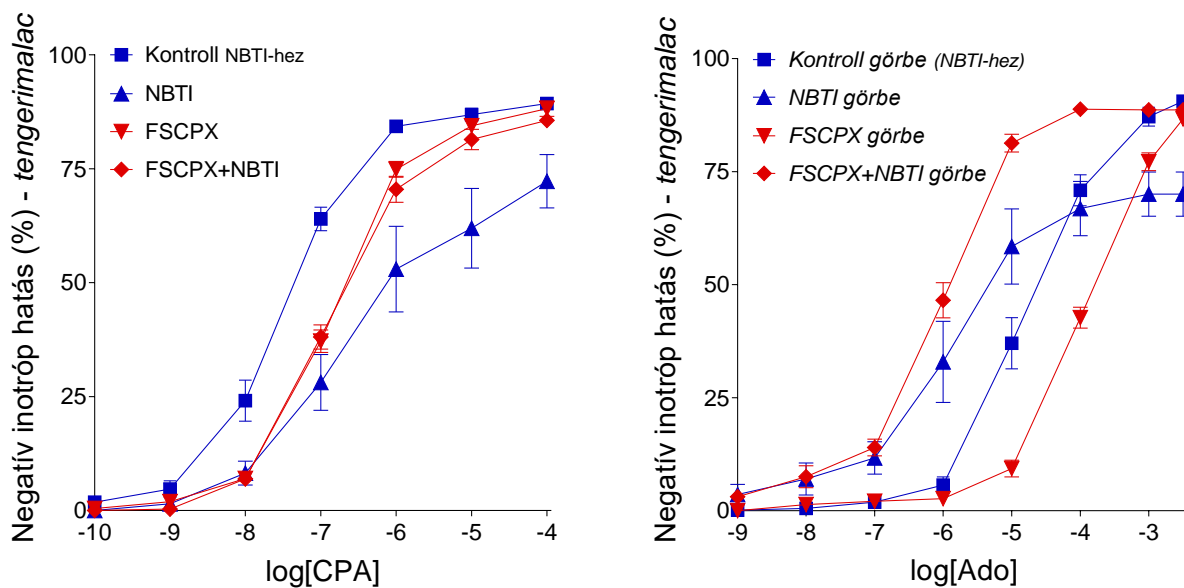
A nitrobenziltioinozinok drasztikusan átformálják az adenosin receptor agonisták koncentráció-hatás (E/c) görbáját két mechanizmus révén, amelyeket általános, illetve specifikus hatásoknak nevezhetünk (Erdei és mtsai, 2018). Az ún. általános módosító hatás az összes adenosin receptor agonista E/c görbáját érinti, mivel ezt az endogén adenosin interstitialis szintjének változása közvetíti, ami a transzmembrán adenosin áramlás blokkolása miatt következik be. A szívben az ENT1 gátlása általában megnöveli az endogén adenosin interstitialis koncentrációját, mivel fiziológias körülmények között az adenosin áramlás a sejt belsejébe irányul (Deussen és mtsai, 1999, 2006). Ez az általános hatás az E_{max} csökkenésében és az EC₅₀ növekedésében nyilvánul meg (a rövidítések magyarázatát lásd: 1. egyenlet a 3.1.2.4. alfejezetben) (5. ábra, bal panel) (Erdei és mtsai, 2018).

A nitrobenziltioinozinok specifikus módosító hatása csak az ENT1-en keresztül nagymértékben transzportálódó adenosin receptor-agonisták (pl. maga az adenosin) E/c görbáját befolyásolja. A specifikus hatás az ilyen agonisták interstitialis koncentrációjának „megkímélődéséből” (lassabb csökkenéséből) fakad az E/c görbe felvétele során (az ENT1 gátlása miatt, ami egyébként eltávolítaná ezeket az agonistákat a sejtfelszíni receptoraik mikrokörnyezetéből). Abban az esetben, ha a specifikus hatást önmagában vizsgáljuk, növeli az E_{max}-ot és csökkenti az EC₅₀-et (tehát éppen ellenkezőleg, mint az általános hatás). Általában az általános és specifikus hatások eredőjét észleljük, amely a mi vizsgálatainkban az E_{max} és az EC₅₀ egyidejű csökkenése volt (5. ábra, jobb panel) (Erdei és mtsai, 2018).

Munkacsoportunk korábbi vizsgálatait során megfigyelte, hogy az FSCPX-szel történő előkezelés paradox módon növelte az adenosinra és a CPA-ra adott direkt negatív inotróp választ, de csak akkor, ha NBTI is jelen volt a rendszerben (5. ábra) (Kiss és mtsai, 2013; Pak és mtsai, 2014; Erdei és mtsai, 2018). Az „FSCPX paradoxon” feloldására az volt a feltételezésünk, hogy az FSCPX előkezelés gátolta az NBTI általános hatását (míg a specifikust nem), melyre egy lehetőség az interstitialis adenosin termelés gátlása (Erdei és mtsai, 2018).

A jelen disszertációt megalapozó vizsgálatainkig ez a hipotézis egyetlen kísérleti modellből (izolált és ingerelt tengerimalac bal pitvar) kapott *ex vivo* adatokon alapult adenosin, CPA, FSCPX és NBTI alkalmazásával (ahogyan arra a 5. ábra is utal). Ezen adatok értelmezéséhez korábban egy egyszerű matematikai modellt dolgoztunk ki (Gesztelyi és mtsai, 2004; Greczer és mtsai, 2010a), majd alkalmaztunk (Zsuga és mtsai, 2017; Szabo és mtsai,

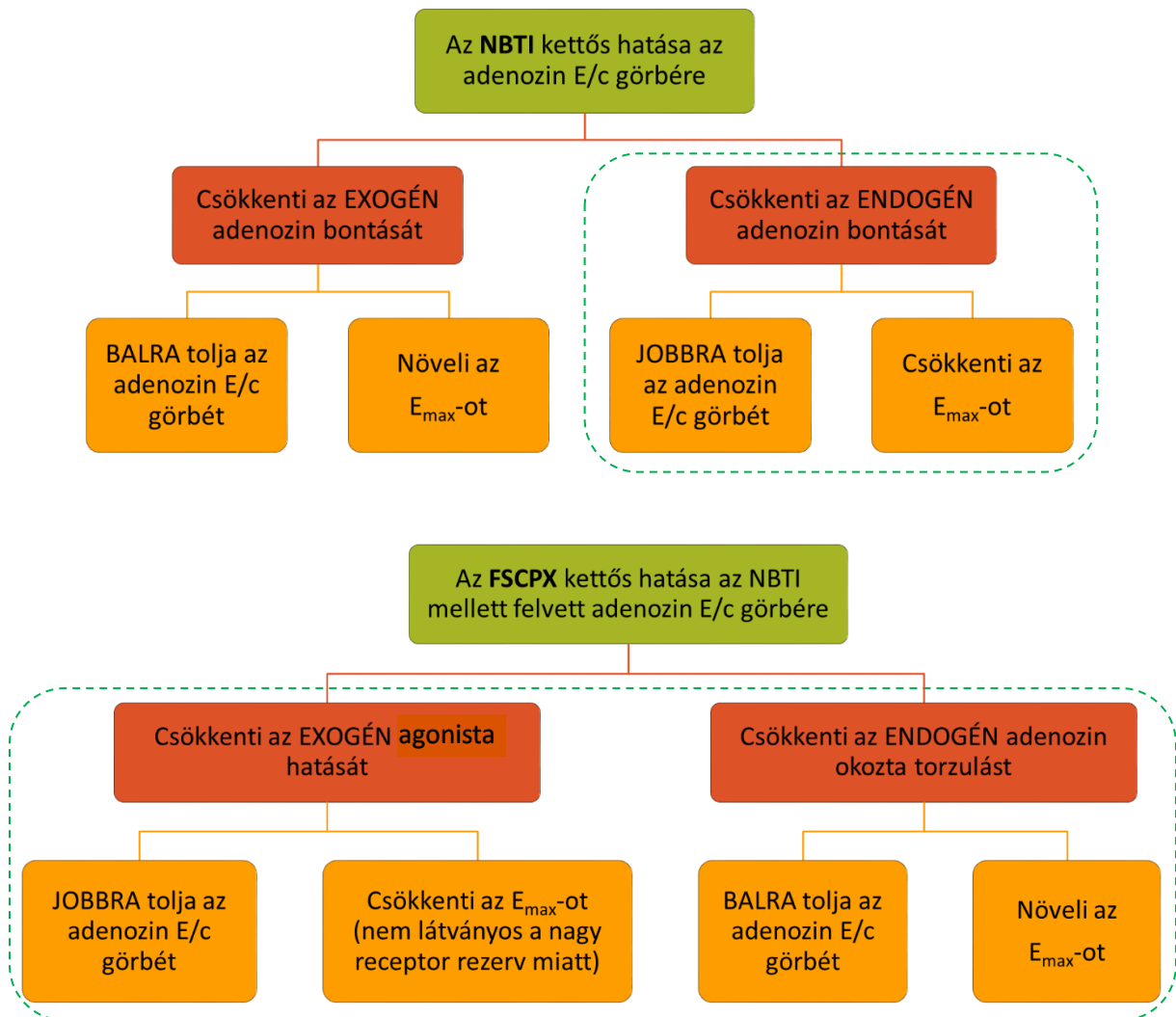
2019a). Az FSCPX paradoxon magyarázatára azt a hipotézist fogalmaztuk meg, hogy az FSCPX gátolhat egy (vagy néhány) enzimet, amelyek részt vesznek az adenzin interstitialis képzésében (Erdei és mtsai, 2018; Szabo és mtsai, 2019a). E feltételezés megengedi, hogy az FSCPX csak az NBTI általános módosító hatását gátolja (az endogén adenzin interstitialis szintjének csökkentésével), de ne befolyásolja az NBTI specifikus módosító hatását (amit a jól transzportálódó exogén agonisták - esetünkben adenzin - szintjének növekedése - pontosabban lassabb csökkenése - okoz) (6. ábra).



5. ábra. Az FSCPX paradox hatása a CPA (balra) és az adenzin (jobbra) kiváltotta direkt negatív inotrópiára NBTI jelenlétében. Az x tengely a CPA (szervkádbeli) moláris koncentrációjának tízes alapú logaritmusát mutatja, míg az y tengely a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenését (a 0% a kiindulási kontrakciós erő változatlanóságát, míg a 100% a pitvarok összehúzódásainak megszűnését jelenti). A szimbólumok az agonistákra adott válaszokat jelölik a csoportokon belül átlagolva (\pm SEM). A kék, illetve a piros E/c görbék az FSCPX előkezelés hiányát, illetve meglétét mutatják. Ado: adenzin; CPA; N^6 -cyclopentyladenosine; NBTI: *S*-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine; E/c: koncentrációhatás; FSCPX: 8-cyclopentyl- N^3 -[3-(4-(fluorosulfonyl)benzoyloxy)propyl]- N^1 -propylxanthine (Erdei és mtsai, 2018)

Az endogén és exogén adenzin megkülönböztetését az indokolja, hogy az E/c görbék hagyományos módon történő kiértékelésekor az endogén adenzin interstitialis szintjének növekedése (még a E/c görbe felvétele előtt) ellentétes hatást gyakorol egy adenzin receptor agonista E/c görbéjére, mint az exogén adenzin interstitialis szintjének növekedése (pontosabban a koncentráció csökkenés kivédése) a vele felvett E/c görbére (Kiss és mtsai,

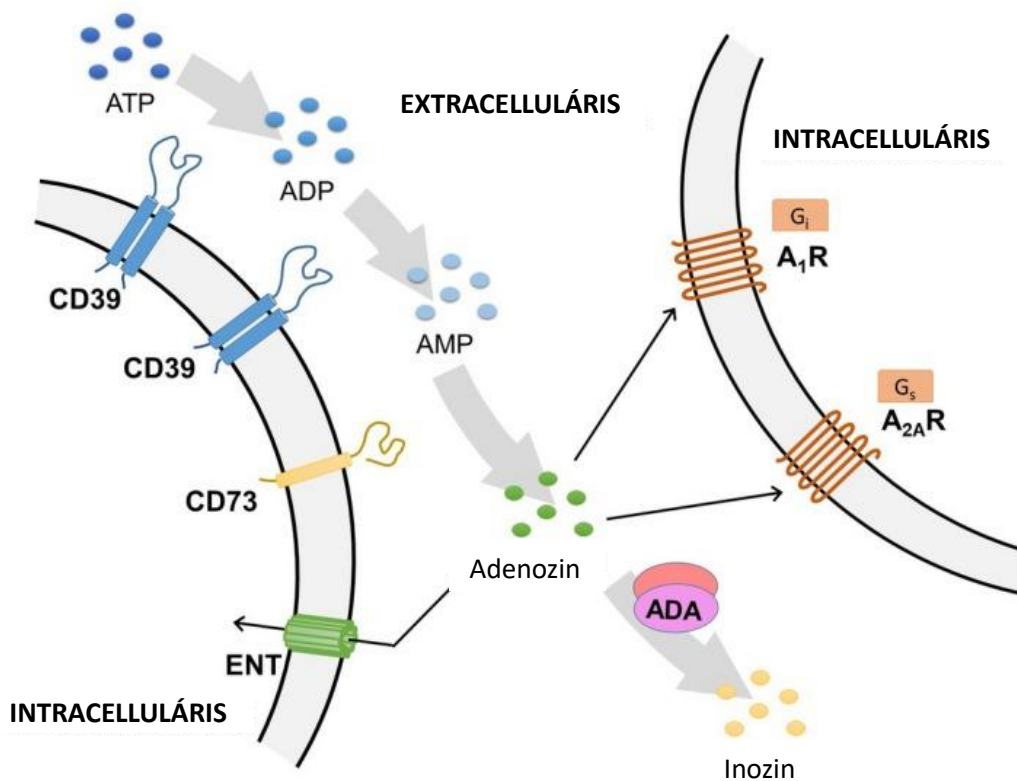
2013; Pak és mtsai, 2014; Erdei és mtsai, 2018). Ennek belátásához tekintjük át kísérleti rendszerünk néhány sajátosságát.



6. ábra. Az NBTI (és természetesen az NBMPR), valamint az FSCPX kettős hatása a mi kísérleti rendszerünkben adenosinnal felvett E/c görbékre. A zöld szaggatott vonalak azokat a mechanizmusokat (és azok következményeit) keretezik, amelyek lassan eliminálódó (és emiatt csak kismértékben transzportálódó) szintetikus A₁ receptor agonistáknál (pl. CPA, CHA) is jelentkeznek. E_{max}: maximális hatás

A nitrobenziltioinozinok azáltal, hogy gátolják az adenosin intracelluláris eliminációját, megemelik az adenosin interstitialis szintjét, függetlenül annak eredetétől (Deussen és mtsai, 2006). A nitrobenziltioinozinok azonban az endogén adenosint már az E/c görbe felvétele előtt felhalmozzák, ami miatt a többlet adenosin már előzetesen elhasználja az A₁ receptorok válaszkapacitásának egy részét, ami csökkenti az (E/c görbéhez később hozzáadott) exogén A₁

receptor agonista (E/c görbével detektálható) hatását (5. ábra, bal panel). A nitrobenziltioinozinok ugyanakkor az exogén adenzint csak az E/c görbe felvétele alatt védik (mivel csak akkor kerül a rendszerbe), így az extra exogén adenzin hatása hozzáadódik az eredetileg kapható hatáshoz, növelve azt (5. ábra, jobb panel).



7. ábra. Az ATP-adenozin tengely. A₁R és A_{2A}R: A₁ és A_{2A} (al)típusú adenzin receptorok ADA: adenzin dezamináz; ATP: adenzin-trifoszfát; ADP: adenzin-difoszfát; AMP: adenzin-monofoszfát; CD39: ekto-apiráz; CD73: ekto-5'-nukleotidáz; ENT: ekvilibratív nukleozid transzporter; G_i: adenilát-cikláz gátló G-fehérje; G_s: adenilát-cikláz stimuláló G-fehérje (Tiwari-Heckler és Jiang, 2019, alapján)

Megjegyzendő, hogy a legtöbb szintetikus A₁ receptor agonista (beleértve a CPA-t és a CHA-t) az adenzinhez képest nagymértékben ellenálló az adenzint átalakító enzimekkel szemben (Pavan és mtsai, 1997), ezért koncentrációjukat a nitrobenziltioinozinok csak kismértékben befolyásolják (főleg kísérleteink időablakában). Ennélfogva a biológiailag stabil szintetikus agonisták alkalmasak a nitrobenziltioinozinok általános E/c görbe módosító hatásának izolált vizsgálatára (5. ábra, bal panel), míg az exogén adenzin E/c görbéje a nitrobenziltioinozinok eredő hatását mutatja, amelyből a stabil agonistákkal szerzett eredmények figyelembevételével lehet következtetni a nitrobenziltioinozinok specifikus E/c görbe módosító hatására (5. ábra, jobb panel; 6. ábra, felső panel). Az FSCPX viszont az A₁

receptor agonisták NBTI (ill. NBMPR) által módosított E/c görbéire mindig kettős hatást fejt ki. Ezek közül az egyik az FSCPX jól ismert antagonista tulajdonságából következik, míg a másik a munkacsoportunk által először megfigyelt és leírt hatás, ami az FSCPX paradoxon alapja (6. ábra, alsó panel).

| Ektonukleotidázok | |
|--|--|
| ekto-nukleozid 5'-trifoszfát difoszfohidroláz enzimesalád (E-NTPDázok) <i>avagy</i> ekto-apirázok | |
| E-NTPDáz1-4 csoport | |
| E-NTPDáz1 <i>avagy</i> lymphocita sejtfelszíni protein CD39 <i>avagy</i> ekto-apiráz CD39 | |
| E-NTPDáz2 <i>avagy</i> ekto-ATPáz CD39L1 | |
| E-NTPDáz3 <i>avagy</i> HB6 | |
| E-NTPDáz4: UDPáz és LALP70 | |
| E-NTPDáz5,6 csoport | |
| E-NTPDáz5 <i>avagy</i> CD39L4 | |
| E-NTPDáz6 | |
| ektonukleotid pirofoszfátáz/foszfodiészteráz enzimesalád (E-NPP család) <i>avagy</i> ekto-foszfodiészteráz/pirofoszfátáz enzimesalád <i>avagy</i> PC-1 család <i>avagy</i> foszfodiészteráz/nukleotide pirofoszfátáz (PDNP) család | |
| rágcsáló plazmasejt differenciációs antigén NPP1 (PC-1) | |
| rágcsáló plazmasejt differenciációs antigén NPP2 (PD-I α és autotaxin) | |
| rágcsáló plazmasejt differenciációs antigén NPP3 (PD-I β <i>avagy</i> B10 <i>avagy</i> gp130 ^{RB13-6}) | |
| alkalikus foszfatáz <i>avagy</i> nonspecifikus ekto-foszfomonoészteráz | |
| lymphocita sejtfelszíni protein CD73 <i>avagy</i> ekto-5'-nukleotidáz | |

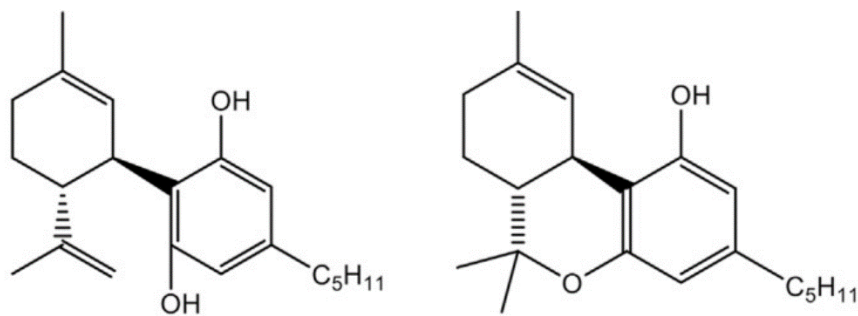
1. táblázat. Az extracelluláris adenosin képzésben résztvevő ektonukleotidázok. Az a két enzim, amelyek kulcsszerepet játszanak a szívizom interstitialis adenosin termelésében, félkövérrel ki vannak emelve. A rövidítések (és a lehetséges alternatív splicing géntermékek) zárójelben. Az E-NTPDáz6 enzim szerepe az irodalmi adatok alapján kérdéses (Zimmermann, 2000, alapján).

A jelen értekezést megalapozó első vizsgálatunk célja az volt, hogy teszteljük az FSCPX egy (vagy néhány) interstitialis adenosin-képző enzimre gyakorolt gátló hatásáról szóló hipotézisünket. Kézenfekvő stratégiaként először az ektonukleotidázok lehetséges szerepét vizsgáltuk az FSCPX-paradoxonban. Az ektonukleotidázok kulcsszerepet játszanak az adenosin extracelluláris képződésében (1. táblázat). A szívben a két legfontosabb ektonukleotidáz a CD39 (ekto-apiráz) és a CD73 (ekto-5'-nukleotidáz), amelyek együttesen

három egymást követő lépést katalizálnak: az ATP ADP-n keresztül történő bontását AMP-re és két foszfát-ionra (CD39), továbbá az AMP bontását adenzinra és egy foszfát-ionra (CD73) (7. ábra; Zimmermann, 2000; Borea és mtsai, 2018, Antonioli és mtsai, 2023). Először enzimgátlási esszéket végeztünk, melyek célja az FSCPX CD39-re és CD73-ra gyakorolt hatásának közvetlen vizsgálata volt. Ezután többféle indirekt megközelítéssel próbáltunk közelebb kerülni feltevésünk igazolásához vagy megcáfolásához.

2.4. A kannabidiol és az adenzinerg rendszer kapcsolata

A kannabidiol (CBD), a *Cannabis sativa* növény legtöbbet vizsgált, nem bódító hatású összetevője, csak egy hattagú, oxigéntartalmú gyűrű felhasadt voltában különbözik a Δ^9 -tetrahydrokannabinoltól (THC), a legismertebb (és leghírhedtebb) fitokannabinoidtól (8. ábra). A CBD-t sokan nem tartják pszichoaktívna (Bielawiec és mtsai, 2020; Peng és mtsai, 2022), míg mások szerint a CBD-t anxiolitikus, antipszichotikus és antidepresszáns tulajdonsága pszichoaktívna teszi, ugyanakkor mégsem kábítószer (nem váltja ki a kannabinoid kábítószerekre jellemző toxikus tünetegyüttest, az ún. kannabinoid tetrádot, továbbá addikciót sem okoz) (Kicman és Toczek, 2020). A CBD fő forrása a kender, amely egy gyűjtőnév, a *Cannabis sativa* három fő fajtájának egyikére utal (Ren és mtsai., 2021).



8. ábra. A CBD (balra) és THC (jobbra) szerkezete

A CBD-t 2018-ban elfogadták a gyermekkori epilepsziák két típusának (Dravet és Lennoux-Gastaut szindróma) kezelésére (Arzimanoglou és mtsai, 2020). A CBD bizonyított és feltételezett molekuláris célpontjainak listája az emberi szervezetben több mint ötven enzimet, ioncsatornát, receptort és transzportert ölel fel, melynek révén a CBD gyulladáscsökkentő, rákellenes, neuroprotektív, görcsoldó, anxiolitikus, antipszichotikus, antidepresszív,

antidiabetikus és elhízás elleni hatást fejt ki (Bielawiec és mtsai, 2020; Sunda és mtsai, 2020; Kicman és Toczek, 2020; Bilbao és mtsai, 2022; Peng és mtsai, 2022; Drugbank-1).

A CBD daganatellenes hatását számos *in vitro* és *in vivo* tanulmány bizonyította (ráktípustól és dózistól függően). A CB₁ és CB₂ kannabinoid receptoroktól függetlenül elősegítette a rákos sejtek apoptózisát. Ennek mechanizmusa még nem teljesen tisztázott, de úgy tűnik, hogy - legalábbis részben - összefüggésbe hozható a ráksejtekben termelődő, oxigén-alapú szabadgyökök termelésének fokozásával. Azt is feltételezik, hogy a CBD a TRPV1 (Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1) receptorok aktiválásával elősegítheti a sejthalált gliómasejtek esetében (Velasco és mtsai, 2016). A CBD emellett növeli az anandamid (AEA) szintjét az endokannabinoid-bontó zsírsav-amid-hidroláz (FAAH) gátlása révén, ami az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) gátlásával apoptózist indukál (Hložek és mtsai, 2017).

A CBD neuroinflammatorikus betegségek, valamint más idegrendszeri kórállapotok (pl. szorongás, epilepszia, szkizofrénia) kezelésében is ígéretes. Antioxidáns, gyulladáscsökkentő és neuroprotektív hatásai miatt alkalmazása felmerült az Alzheimer-kór kezelésében is. A CBD mérsékli a tau fehérje foszforilációját (csökken a glikogén-szintáz-kináz foszforilációja, ezáltal a Wnt/ β -katenin útvonal felszabadul), gátolja az acetilkolinesterázt és csökkenti az amiloid-béta (A β) felhalmozódását is. Ezen kedvező hatások feltehetően nem csak kannabinoid (CB) receptor-mediálta folyamatok. A CBD agonistaként hat a PPAR γ receptoron (peroxiszóma proliferátor aktivált γ receptor), melynek aktivációja gyulladáscsökkentő hatású és csökkenti az A β depozitumok mennyiségét. Továbbá beszámoltak a CBD nem-daganatos sejteken tapasztalható antiapoptotikus hatásáról is, az A β clearance és az amiloid prekursor protein (APP) ubiquitináció fokozásáról és a reaktív gliosis mérsékléséről. A CBD 2,5, illetve 10 ml/kg intraperitonealis dózisban alkalmazva egerekben dózisfüggően csökkentette az IL-1 β (interleukin-1 béta) gyulladással citokin termelődését, mérsékelte az iNOS (indukálható nitrogén-monoxid-szintáz) és a gliofibrilláris savas fehérje (GFAP) expresszióját. Az NF- κ B (nukleáris faktor kappa B) útvonal (p50 és p65 alegység) is gátlás alá kerül, csökken az NO, az IL-1 β és a TNF- α (tumornekrózis faktor α) szekréció. A CBD autofágiára kifejtett kedvező hatása is hozzájárul az A β depozitumok csökkenéséhez (Ożarowski és mtsai, 2021).

Az immunrendszerrel kapcsolatos kutatások szerint Wistar patkányokban a CBD 2,5 mg/ttkg dózisa 14 napig adva nem okozott lymphopeniát, sőt, a natural killer (NK) sejtek száma még nőtt is), az 5 mg/ttkg dózis viszont már csökkentette a lymphocyta számot. Ezek alapján

úgy tűnik, hogy a CBD a specifikus immunválaszt gyengíti, míg a nem specifikus immunitás hatékonyabbá válik, ami főleg az antitumor és vírusellenes aktivitásnak kedvez (Booz, 2011).

Hím Wistar patkányokban a CBD csökkentette a stressz hatását a viselkedésre és a cardiovascularis rendszer működésére, melynek hátterében a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese (HPA) tengely gátlása és az 5-HT_{1A} (1A altípusú szerotonin – 5-hidroxi-triptamin – receptor) receptor jelátvitelének fokozása állt. Enyhe, krónikus stressznek kitett hím Sprague-Dawley patkányokban a CBD kezelés gátolta az anxiogén és depresszív viselkedést CB₁ és CB₂ receptorokon hatva. Sejtkultúrában a CBD elősegítette a progenitor sejtek proliferációját CB₁ és CB₂ receptorok mediálásával, továbbá az anandamid szintjének növelése révén (a CBD negatív allosterikus modulátor a CB₁ receptoron és kis affinitású inverz agonista a CB₂ receptoron). Ezen eredmények igazolják az endokannabinoid rendszer részvételét a CBD antidepresszáns-szerű hatásainak létrehozásában (García-Gutiérrez és mtsai, 2020).

A CBD a CB₁ receptor negatív modulálása révén mérsékelheti az elhízást. Az elhízás a zsír felhalmozódásán túl krónikus, alacsony fokú gyulladáshoz hasonló állapottal jár („metaflammáció”). CB₁ és CB₂ receptorok előfordulnak a zsigeri és a subcutan zsírszövetben is, melyek ígéretes célpontok lehetnek gyulladáscsökkentőként és az elhízás ellen. Kimutatták, hogy a CBD dózis- és időfüggő módon csökkentette a zsír felhalmozódását olajsavval kezelt 3T3-L1 adipocytákban. Ezen eredmények a CBD lehetséges lipolízis-indukáló hatására utalnak (Bielawiec és mtsai, 2020).

A CBD késleltette a diabétesz mellitusz (DM) kialakulását NOD (non-obese diabetes-prone) egerekben. Ennek magyarázata az lehet, hogy megváltoztatta a T lymphocyták arányát (a gyulladást termelő T_{H1} helyett a T_{H2} került előtérbe), valamint fokozta a gyulladáscsökkentő citokinek (pl. IL-10) szekrécióját. A magas vércukorszint fokozott oxidatív stresszt okoz, melynek hatására az endotéliumon olyan adhéziós molekulák jelennek meg, melyek káros immunválaszhoz vezetnek. A CBD bizonyítottan csökkentette ezen adhéziós molekulák számát, ezáltal mérsékelte az atherosclerosis rizikóját. Szintén a CBD gyulladáscsökkentő hatásának tulajdonítható, hogy védő hatásának bizonyult a diabéteszes retinopathiával szemben, csökkentve a retina idegsejtjeinek pusztulását. Ez azzal magyarázható, hogy a CBD csökkentette az oxidatív stresszt a Müller-féle gliasejtjeiben, valamint csökkentette ezekben a sejtekben a glutamin-szintáz aktivitását, ami alacsonyabb glutamin-szinthez vezetett és ezáltal védő hatású volt. Egereknél diabéteszes cardiomyopathiában a CBD-vel történő elő- és utókezelés egyaránt mérsékelte a fibrózist és a sejthalált, a myocardialis diszfunkciót, a gyulladást és az oxidatív stresszt. Hyperglycaemiás

környezetben a CBD mérsékelte mind az oxigén-, mind a nitrogén-alapú szabadgyökök termelődését. Diabéteszes retinopathiában az endokannabinoidok szintje emelkedett és a CB₁ expresszió is fokozódik a szemben. Diabétesz mellitus esetén rágcsőknál a CB₁ receptor gátlása kivédte a retina idegsejtek pusztulását. Azt is megfigyelték, hogy a hyperglycaemia csökkentette a FAAH expresszióját, ami a kannabinoidok lebontásáért felelős, ezáltal fokozva az anandamid (AEA) szintjét és a CB₁ jelátviteli útvonalon keresztül az apoptózist (Horváth és mtsai, 2012).

A CBD az adenozinerg rendszerre is hatással van (Carrier és mtsai, 2006; Liou és mtsai, 2008; Pandolfo és mtsai, 2011; Ibeas Bih és mtsai, 2015; Gonca és mtsai, 2015; Sunda és mtsai, 2020). A kutatások szerint a szívizom funkciója szempontjából a CBD két legfontosabb célpontja igazoltan az ENT1 (neuronokban, makrofágokban, retina- és agyi mikroglia-sejtekben: Carrier és mtsai, 2006; Liou és mtsai, 2008; Pandolfo és mtsai, 2011) és lehetséges módon az A₁ adozin receptor (a szívben: Gonca és mtsai, 2015; Drugbank-2).

Az eddigi kísérletes adatokból kiindulva tehát a CBD legalább két közvetlen támadásponton is beavatkozhat a szívizom adenozinerg jelátvitelére: az A₁ adozin receptoron (Gonca és mtsai, 2015) és az ENT1 transzporterén (Carrier és mtsai, 2006; Liou és társai, 2008; Pandolfo és mtsai., 2011). Vizsgálatainkig ezen útvonalak hozzájárulásának mértéke a CBD hatásához tisztázatlan volt (Sunda és mtsai, 2020; Ibeas Bih és mtsai, 2015; Grubb és mtsai, 2021).

A jelen értekezést megalapozó második vizsgálatunk célja az volt, hogy feltárja azt a fő mechanizmust, amellyel a CBD kifejti hatását a szívizom adenozinerg jelátvitelére. Azért, hogy különbséget tudjunk tenni az A₁ adozin receptor agonizmus és az adozin transzport gátlása révén létrejövő adenozinerg aktivációk között, egy saját fejlesztésű módszert alkalmaztunk, a receptorális válaszkésztség módszert (RRM). Az RRM lehetővé teszi A₁ receptor agonisták koncentráció-hatás (E/c) görbéinek korrekcióját a többlet adozin okozta torzításra (Kiss és mtsai, 2013; Zsuga és mtsai, 2017; Erdei és mtsai, 2018; Szabó és mtsai, 2019a).

A CBD lehetséges terápiás előnyei alapján, melyek mind 1-es, mind 2-es típusú diabetes mellitusban érintik a szívet is (Rajesh és mtsai, 2010; Bielawiec és mtsai, 2020; Sunda és mtsai, 2020; Peng és mtsai, 2022), ezeket a vizsgálatainkat ZDF (Zucker Diabetic Fatty) patkányokból izolált pitvarokon végeztük. Az „obese” típusú ZDF patkány a 2-es típusú cukorbetegség széles körben használt állatmodellje. A 2-es típusú diabetes mellitus egyre gyakrabban előforduló betegség, amely világszerte a vakság, veseelégtelenség, szívroham, stroke, alsó végtagi

amputáció és - általánosságban - a korai halálozás egyik fő oka (Henning, 2018; WHO, 2019; WHO, 2023). Egy "beteg" állatmodellnek nagyobb translációs potenciálja lehet, mivel az így kapott eredmények megbízhatóbban alkalmazhatók a klinikai problémák megoldására. Ez összhangban van azzal a megfigyeléssel, miszerint egyes védőmechanizmusok, melyek egészséges állapotban jelen vannak, bizonyos kóros körülmények között nem érvényesülnek (Juhász és mtsai, 2004).

3. Anyagok és módszerek

3.1. Az FSCPX vizsgálatával kapcsolatos módszerek

3.1.1. *In vitro* CD39 és CD73 Inhibitor Screening Assay Kit mérések

3.1.1.1. Vegyszerek és oldatok

Kísérleteink során az alábbi vegyszereket és kitéket használtuk: dimetil-szulfoxid (DMSO); 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (CPX); 8-cyclopentyl-*N*³-[3-(4-(fluorosulfonyl)benzoyloxy)propyl]-*N*¹-propylxanthine (FSCPX); nátrium-polioxometallát (POM-1, CD39 Inhibitor Screening Assay Kit részeként); dinátrium *N*⁶-benzyl- α,β -methyleneadenosine-5'-diphosphate (PSB-12379); CD39 Inhibitor Screening Assay Kit és CD73 Inhibitor Screening Assay Kit.

A CPX-et és a DMSO-t a Merck KGaA-tól (Darmstadt, Németország) vásároltuk. Az FSCPX-et gyártó cég a Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg, Németország), magyarországi forgalmazója a BIO-Kasztel, Ltd. (Budapest, Magyarország). A Kitéket (beleértve a POM-1-et is) a BPS Bioscience (San Diego, CA, USA) cég gyártotta és a THP Medical Products Vertriebs GMBH (Vienna, Ausztria) forgalmazta. A PSB-12379 gyártója a Tocris Bioscience (Bristol, UK), forgalmazója a Bio-Techne R&D Systems, Ltd. (Budapest, Magyarország) volt. A POM-1-et desztillált vízben oldottuk fel, továbbá az oldat formájában kézhez kapott PSB-12379 hígítása is desztillált vízben történt. A CPX és az FSCPX oldószereként DMSO-t használtunk, hígításuk desztillált vízzel történt (amikor erre szükség volt).

3.1.1.2. Protokoll

A POM-1, PSB-12379, CPX és FSCPX gátló hatását a vizes oldatban diszpergált CD39-re (ekto-apiráz) és CD73-ra (ekto-5'-nukleotidáz) *in vitro* malachit-zöld módszerrel határoztuk meg CD39 és CD73 Inhibitor Screening Assay Kit-ek segítségével, a gyártó utasításai szerint.

Mindkét kit esetében 14 különböző reakcióelegyet készítettünk 96-well plate-en: negatív kontroll (vak, 8 well), 1% DMSO-t tartalmazó negatív kontroll (4 well), 10% DMSO-t tartalmazó negatív kontroll (4 well), pozitív kontroll (8 well), 1% DMSO-t tartalmazó pozitív kontroll (4 well), 10% DMSO-t tartalmazó pozitív kontroll (4 well), 20 μ M POM-1 tartalmú

inhibitor kontroll (8 well), 200 μ M POM-1 tartalmú inhibitor kontroll (8 well), 0.1 μ M PSB-12379 tartalmú inhibitor kontroll (8 well), 1 μ M PSB-12379 tartalmú inhibitor kontroll (8 well), 10 μ M FSCPX-et tartalmazó reakcióelegy (1% DMSO-ban oldva, 8 well), 100 μ M FSCPX-et tartalmazó reakcióelegy (10% DMSO-ban oldva, 8 well), 10 μ M CPX-et tartalmazó reakcióelegy (1% DMSO-ban oldva, 8 well), 100 μ M CPX-et tartalmazó reakcióelegy (10% DMSO-ban oldva, 8 well).

A CD39 és CD73 enzimaktivitások mérését a gyártó utasításai szerint végeztük 630 nm hullámhosszon Varioskan LUX Multimode Microplate Reader spektrofotométer (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) segítségével.

3.1.2. *Ex vivo* funkcionális vizsgálatok

3.1.2.1. Vegyszerek és oldatok

A szervkádak feltöltéséhez módosított Krebs-Henseleit puffert (Krebs-oldat) használtunk. A Krebs-oldat összetétele a következő volt (mM-ban): NaCl: 118, KCl: 4.7, CaCl₂: 2.5, NaH₂PO₄: 1, MgCl₂: 1.2, NaHCO₃: 24.9, glükóz: 11.5, aszkorbinsav: 0.1, mindez desztillált vízben oldva.

A kísérletek során az alábbi vegyszereket használtuk: adenzin, *N*⁶-cyclohexyladenosine (CHA); *N*⁶-cyclopentyladenosine (CPA); *S*-(4-nitrobenzyl)-6-thioinosine (NBMPR), *S*-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine (NBTI); FSCPX és PSB-12379. Habár az „NBMPR” és az „NBTI” rövidítéseket gyakran szinonimaként használják, nálunk különböző vegyületeket jelölnek.

Az FSCPX-et és a PSB-12379-et leszámítva (lásd fent) a vegyületeket a Merck KGaA-tól (Darmstadt, Germany) vásároltuk. Az adenzint 36 °C-os Krebs-oldatban oldottuk fel. A CHA-t és CPA-t 1:4 (v/v) etanol-desztillált víz elegyben oldottuk. Az NBMPR, NBTI és FSCPX oldása DMSO-ban történt. Minden törzsoldat koncentrációja 10 mM volt. Az oldatként kézhez kapott PSB-12379-et fiziológiás nátrium-klorid oldatban (0,9% w/v NaCl) hígítottuk 1 mM koncentrációjára. Az adenzin, CHA és CPA törzsoldatok hígítása Krebs-oldatban történt.

3.1.2.2. Állatok és csoportok

Az állatok tartását, felhasználását és az állatkísérletekre vonatkozó protokollokat a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága jóváhagyta (5/2020/DEMÁB).

Kísérleteinkhez hím Wistar patkányokat (400-500 g) és hím Hartley tengerimalacokat (500-700 g) használtunk. Az állatok exterminalása dekapitálással történt. A bal pitvari fülcséket gyorsan eltávolítottuk és 10 mN nyugalmi feszülés mellett 10 ml Krebs-oldatot (36 °C; pH = 7.4) tartalmazó, karbogénnel szellőztetett (95% O₂ és 5% CO₂), függőleges kiképzésű szervkádakban rögzítettük (Experimetria TSZ-04; Experimetria Kft, Budapest, Magyarország). A preparátumokat platina elektródokkal pontszerűen ingereltük (3 Hz, 1 ms, a küszöbfeszültség kétszeresével) programozható stimulátor (Experimetria ST-02; Experimetria Kft, Budapest, Magyarország) és erősítő (Experimetria PST-02; Experimetria Kft, Budapest, Magyarország) segítségével.

A kontrakciós erőt az izometriás összehúzódások amplitúdójával jellemeztük, amit transzducerrel (Experimetria SD-01; Experimetria Kft, Budapest, Magyarország) és jelerősítővel (Experimetria SG-01D; Experimetria Kft, Budapest, Magyarország) mértünk, hőirókaros poligráffal rögzítettünk (Medicor R-61 6CH Recorder; Medicor Művek, Budapest, Magyarország). Mivel a nyugalmi kontraktilitás csökkenését követtük, a direkt negatív inotróp hatást határoztuk meg, ami klasszikus szervkád rendszerben (Weston és mtsai., 2022) izolált, ingerelt bal pitvari fülcsén mérve egyszerű és rendkívül megbízható módja a myocardialis A₁ adenozin receptor funkció vizsgálatának.

Amikor az FSCPX és az NBMPR közötti potenciális interakciót vizsgáltuk (lásd 2.2. alfejezet), a patkány bal pitvari fülcséket véletlenszerűen 5 csoportba soroltuk: „Kontroll NBMPR-hez” (n = 4), „NBMPR” (n = 5), „Kontroll FSCPX & FSCPX+NBMPR-hez” (n = 5), „FSCPX” (n = 5) és „FSCPX+NBMPR” (n = 4).

A PSB-12379 és NBTI közötti lehetséges interakció vizsgálatához (lásd 2.3. alfejezet) a tengerimalac bal pitvari fülcséket véletlenszerűen 6 csoportba osztottuk: „Kontroll (CPA-hoz)” (n = 4), „NBTI CPA-hoz” (n = 6), „PSB CPA-hoz” (n = 4), „PSB+NBTI (CPA-hoz)” (n = 5), „Kontroll+NBTI+PSB (Ado-hoz)” (n = 7) és „Kontroll+PSB+NBTI (Ado-hoz)” (n = 6).

Az FSCPX különféle beadási gyakoriságainak vizsgálata során (lásd 2.4. alfejezet) a patkány, ill. tengerimalac bal pitvari fülcséket véletlenszerűen 4 csoportba soroltuk: „DMSO (5 ciklus)” (n = 10 ill. 7), „FSCPX (1 ciklus)” (n = 8 ill. 6), „FSCPX (2 ciklus)” (n = 9 ill. 7) és „FSCPX (5 ciklus)” (n = 8 ill. 8).

3.1.2.3. Protokollok

A Krebs-oldattal feltöltött, karbogénnel szellőztetett szervkádakba (a preparátumok rögzítése után 25 perccel) 100 μM adenzint adtunk, melyet 2 perc elteltével Krebs-oldattal kimosunk a rendszerből (adenozin „edzés”). 20 perc mosás után kumulatív E/c görbét vettünk fel adenzinnal, majd ismét 20 perc Krebs-oldattal történő mosás után az egyes protokollokra jellemző kezelések és E/c görbék következtek.

Az FSCPX és az NBMPR közötti lehetséges interakció vizsgálatok az 5 csoportba sorolt patkány bal pitvarokon öt, egy korábbi vizsgálatunk során már alkalmazott protokollt (P1a, P1b, P2a, P2b and P2c) követtünk (Erdei és mtsai, 2018; ld. Függelék), melyeken három módosítást végeztünk: CPA helyett CHA-t, míg NBTI helyett NBMPR-t használtunk, valamint néhány korábban alkalmazott protokollt (Erdei és mtsai, 2018) kihagytunk (amikor az adenzint használtuk fő agonistaként).

Minden pitvart a következő *in vitro* kezeléseknak vetettük alá: „Kontroll NBMPR-hez” esetében 10 μl DMSO-t adtunk 15 percig; az „NBMPR” csoport esetében 10 μM NBMPR-t (DMSO-ban oldva, szervkádanként 10 μl térfogatban) adtunk 15 percig; „Kontroll FSCPX & FSCPX+NBMPR-hez” esetében 10 μl DMSO-t adtunk 45 percig, ezt követően 60 perces mosási periódus után 10 μl DMSO-t adtunk 15 percig; az „FSCPX” csoport esetében 10 μM FSCPX-et (DMSO-ban oldva, szervkádanként 10 μl térfogatban) adtunk 45 percig, ezt követően 60 perces mosási periódus után 10 μl DMSO-t adtunk 15 percig; az „FSCPX+NBMPR” csoport esetében 10 μM FSCPX-et (DMSO-ban oldva, szervkádanként 10 μl térfogatban) adtunk 45 percig, ezt követően 60 perces mosási periódus után 10 μM NBMPR-t (DMSO-ban oldva, szervkádanként 10 μl térfogatban) adtunk 15 percig. Végül, az utolsó szervkádhoz adott vegyület (vagy oldószer) kimosása nélkül kumulatív CHA E/c görbét vettünk fel minden patkány bal pitvaron. A 45 perces inkubációs periódusok során 22,5 percnél minden preparátum esetében egy körülbelül fél perces intenzív mosást iktattunk be, majd a fent említett módon visszamértük a csoportokra jellemző 10 μM FSCPX-et vagy a 10 μl DMSO-t. Ez a most ismertetett vizsgálat során “FSCPX (2 ciklus)” beadási rendet jelentett (ami az összes előző tanulmányunkra is jellemző volt az FSCPX beadásakor).

A PSB-12379 és NBTI között lehetséges interakció vizsgálatok minden tengerimalac bal pitvar átesett a hat protokollnak megfelelő kezeléseken (hasonlóan az előző bekezdésben leírtakhoz). A fő különbségek a következők voltak: NBMPR helyett NBTI használata; CHA helyett adenzin és CPA használata; ahol az adenzin a fő agonista, ott a korábbi tanulmányunkban is alkalmazott protokoll használata (Erdei és mtsai, 2018); valamint FSCPX

helyett PSB-12379 használata (az ehhez megfelelő inkubációs és kimosási szakokat alkalmazva). Így a „Kontroll CPA-hoz” csoport pitvaraihoz 10 μ M DMSO-t adtunk 15 percig; az „NBTI CPA-hoz” pitvaraihoz 10 μ M NBTI-t adtunk (DMSO-ban oldva, szervkádanként 10 μ l térfogatban) 15 percig; a „PSB (CPA-hoz)” pitvaraihoz 10 μ l DMSO-t és 3 μ M PSB-12379-et adtunk 15 percig; a „PSB+NBTI CPA-hoz” pitvaraihoz 3 μ M PSB-12379-et adtunk 15 percig (kimosási periódus nélkül) és 10 μ M NBTI-t (DMSO-ban oldva, szervkádanként 10 μ l térfogatban) további 15 percig; a „Kontroll+NBTI+PSB (Ado-hoz)” pitvaraihoz 10 μ M NBTI-t (DMSO-ban oldva, szervkádanként 10 μ l térfogatban) adtunk; a „Kontroll+PSB+NBTI (Ado-hoz)” pitvaraihoz 10 μ l DMSO-t és 3 μ M PSB-12379-et adtunk 15 percig. Ezután a „CPA-hoz” névvel jelölt pitvarok esetében kumulatív CPA E/c görbét vettünk fel (és ez jelentette a protokoll végét), ugyanakkor az „Ado-hoz” kifejezéssel megjelölt pitvarok esetében kumulatív adenozin E/c görbét vettünk fel (pitvaronként ez volt a második adenozin E/c görbe). Ezután az „Ado-hoz” névvel jelölt pitvarokhoz 3 μ M PSB-12379-et adtunk 15 percig, utána 10 μ M NBTI-t (DMSO-ban oldva, szervkádanként 10 μ l térfogatban) további 15 percig. Végül ezen utolsó 2 csoportban egy harmadik kumulatív adenozin E/c görbe görbét is felvettünk. Így összességében a „Kontroll+NBTI+PSB Ado-hoz” és a „Kontroll+PSB+NBTI Ado-hoz” pitvarok esetében háromféle adenozin E/c görbét vettünk fel: egy kontroll (első) görbét, egy NBTI- és egy PSB-12379-kezelt (második) görbét, valamint egy PSB+NBTI-kezelt (harmadik) görbét.

Az FSCPX eltérő számú beadásainak vizsgálata során minden patkány és tengerimalac bal pitvaron négy protokoll alapján végeztük el a kezeléseket. A „DMSO (5 ciklus)” csoporthoz 10 μ l DMSO-t adtunk 45 percig, majd 75 perces kimosási fázis következett, míg a többi három csoport esetében 10 μ M FSCPX (DMSO-ban oldva, szervkádanként 10 μ l térfogatban) kezelést alkalmaztunk 45 percig, amelyet szintén 75 perces kimosási fázis követett. Fontos megjegyezni, hogy az „FSCPX (1 ciklus)” csoport esetében a 45 perces inkubációs ciklust nem szakítottuk meg, a többi csoport esetében viszont egy vagy több rövid, de intenzív kimosási fázist iktattunk be, melyet a 10 μ M FSCPX (DMSO-ban oldva, szervkádanként 10 μ l térfogatban) vagy 10 μ l DMSO (önmagában) újbóli bemérése követett. Az „FSCPX (2 ciklus)” csoportban a 45 perces inkubációt 22.5 percnél megszakítottuk egy rövid, de intenzív mosással, majd a 10 μ M FSCPX-et (DMSO-ban oldva, szervkádanként 10 μ l térfogatban) újra hozzáadtuk. Az „FSCPX (5 ciklus)” és a „DMSO (5 ciklus)” csoportokban a 45 perces inkubációt 4 részre osztottuk: 9 percenként intenzív kimosást alkalmaztunk, melyek végeztével visszaadtuk a 10 μ M FSCPX-et (DMSO-ban oldva, szervkádanként 10 μ l térfogatban) vagy a 10 μ l DMSO-t. Végezetül minden pitvar esetében kumulatív CPA E/c görbét vettünk fel.

3.1.2.4. Az E/c görbék kiértékelése

Az FSCPX különböző beadási számának vizsgálata során felvett CPA E/c görbéket csoportonként átlagoltuk, majd az átlagolt E/c görbékre a Hill egyenletet illesztettük (Gesztelyi és mtsai, 2012):

$$E = E_{max} \cdot \frac{c^n}{c^n + EC_{50}^n} \quad (1)$$

ahol E: a kiváltott hatás, melyet a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenéseként definiáltunk; c: az alkalmazott agonista koncentrációja; E_{max} : a maximális hatás; EC_{50} : a maximális hatás felét kiváltó agonista koncentráció; n: Hill koefficiens (Hill slope faktor, meredekségi tényező).

A görbeillesztést kétféle módon végeztük: individuálisan (az átlagolt CPA E/c görbék egymástól függetlenül lettek illesztve) és globálisan (az átlagolt CPA E/c görbék illesztése közös E_{max} és n paraméterekkel történt).

3.2. CBD-vel kapcsolatos módszerek

3.2.1. Vegyszerek és oldatok

Munkánk ezen szakaszában az alábbi vegyületeket használtuk: adenzin; N^6 -cyclopentyladenosine (Sigma, St. Louis, MO, USA); kannabidiolban (CBD) gazdag kenderből (hemp) készült olaj (pszichoaktív komponensektől mentes), amit "Vitality CBD Oral Drops/Spray 4800mg Natural" néven közvetlenül a gyártótól rendeltünk (Vitality CBD Ltd, Birmingham, Egyesült Királyság) (ld. a hivatkozások között mint: CBD, 2021); napraforgóolaj, "Vénusz" néven forgalmazott termék (Bunge CJSC, Martfű, Magyarország).

A CPA-t 1:4 (v/v) etanol - desztillált víz elegyben, az adenzint pedig 36 °C-os Krebs-oldatban oldottuk (a Krebs-oldat összetétele a 3.1.2.1. alfejezetben). Minden törzsoldat koncentrációja 10 mM volt, a további hígításokat Krebs-oldattal végeztük. A kender olajos kivonatát a gyártó MCT (közepes láncú triglicerid) olajjal hígította. Mi a terméket az *in vivo* kezelés során napraforgóolajjal hígítottuk tovább.

3.2.2. Állatmodellek és kísérleti csoportok

Az állatok felhasználását a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága hagyta jóvá (5/2022/DEMÁB; 2022. április 14.). Hím, 10 hetes, „lean” (fenotípusosan egészséges), valamint „obese” típusú ZDF patkányokat használtunk, melyeket az AnimaLab Hungary Kft-től szereztünk be (Vác, Magyarország), a Charles River Laboratories International Inc. (Wilmington, MA, USA) magyarországi forgalmazójától.

6 hónapos korukig a lean ZDF patkányokat konvencionális tápon tartottuk (S8106-S011 SM R/M-Z+H, forgalmazó: Toxi-Coop Kft., Budapest, Magyarország; gyártó: Spezialdiäten GmbH, Soest, Németország), míg az obese ZDF patkányok diabetogén tápot kaptak (Purina 5008 rat chow, melyet az AnimaLab Hungary Kft-től szereztünk be a Charles River Laboratories International Inc. ajánlása alapján).

A 6 hónapos obese ZDF patkányokat véletlenszerűen két csoportba soroltuk: „Obese ZDF” (n = 4) és „CBD-kezelt obese ZDF” (n = 6), míg a lean állatok a „Lean ZDF” csoportot alkották (n = 8). A korábban bevezetett étrend folytatása mellett az Obese ZDF csoportban lévő állatok intragastricus szondán át négy héten keresztül naponta 0,2 ml napraforgóolajat kaptak, míg a CBD-kezelt obese ZDF csoportban lévők 60 mg/ttkg/nap CBD-t (0,2 ml ösztérfogatban).

A patkányok *in vivo* CBD kezelési protokolljának célja az emberi felhasználás modellezése volt, különös tekintettel az antidiabetikus indikációra. A legtöbb humán vizsgálatban a CBD ismétlődő, orális adagolását körülbelül 1-50 mg/kg/nap dózissal végezték 1-6 héten keresztül (Millar és mtsai, 2019; Kicman és Toczek, 2020). A „patkány dózis = humán dózis x 6,2” képlet felhasználásával (Nair és Jacob, 2016) 6,2-310 mg/kg/nap dózistartományt kaptunk. Egereknél és patkányoknál leggyakrabban 10 mg/kg/nap dozírozást alkalmaztak, i.p. vagy *per os*, 1-6 hétig (Wheal és mtsai, 2017; Karimian Azari és mtsai, 2020). Érdekes módon az i.p. és az orális adagolás hasonló koncentrációt eredményezett a patkányokban mind a plazmában, mind az agyban (Deiana és mtsai, 2012). Diabéteszes rágcsálómodellekben a CBD kezelés időtartama 1-11 hét között változott, de a leggyakoribb időtartam 4 hét volt (El-Remessy és mtsai, 2006; Weiss és mtsai, 2006, 2008; Rajesh és mtsai, 2010; Santiago és mtsai, 2019; Dziwenka és mtsai, 2020). Mindent mérlegelve úgy döntöttünk, hogy 60 mg/kg/nap CBD-t alkalmazunk, *per os*, 4 héten keresztül.

A napraforgóolaj, illetve CBD kezelés megkezdése előtti napon az éhgyomri vércukor koncentráció (mmol/l-ben kifejezve) (átlag ± SEM): $5,9 \pm 0,1$, $19,1 \pm 2,1$ és $23,3 \pm 1,4$ volt, míg az *in vivo* kezelés befejezését követő napon $5,6 \pm 0,1$, $19,3 \pm 1,7$ és $20,5 \pm 1,7$ a Lean ZDF,

Obese ZDF és a CBD-kezelt obese ZDF csoportokban (az említés sorrendjében) (társszerzői mérések).

Az *in vivo* kezelések kezdetén az állatok testtömege (grammban kifejezve) (átlag \pm SEM): $388,8 \pm 7,6$, $364,5 \pm 25,8$ és $368,1 \pm 14,2$ volt, míg az *in vivo* kezelések végére ezek az értékek $413,2 \pm 8,2$, $403,5 \pm 28,9$ és $398,4 \pm 17,6$ -ra változtak a Lean ZDF, Obese ZDF és a CBD- kezelt obese ZDF csoportokban (az említés sorrendjében). Felhasználásuk előtt az obese típusú ZDF patkányoknál előrehaladott 2-es típusú cukorbetegség volt jelen, és ebben az állapotban a testsúlyuk már valamivel kisebb volt, mint a lean kontrolloké (az „obese” és „lean” nevek ellenére) (társszerzői mérések).

Az állatok exterminálása előtt mindhárom csoportban az alábbi vizsgálatokat végeztük el az *in vivo* funkcionális állapotukra vonatkozó információk gyűjtése érdekében: Morris water maze teszt, orális glükóztolerancia teszt, majd 100/10 mg/kg ketamin/xilazin anesztézia alkalmazásával elektoretinográfia, elektrokardiográfia és echokardiográfia. (Az így nyert adatokat egy kollaboráló munkacsoport a későbbiekben fogja felhasználni.)

3.2.3. *Ex vivo funkcionális vizsgálatok és a protokollok*

A bal pitvari fülcsék preparálása a 3.1.2.2. alfejezetben leírtaknak megfelelően történt. Mivel ebben a vizsgálatban sem történt előkezelés kontraktilitást befolyásoló szerrel, itt is az adenosin receptor agonisták által kiváltott direkt negatív inotróp hatást mértük.

3.2.4. *Az E/c görbék korrekciója*

Ha egy figyelmen kívül hagyott, többlet agonista koncentráció jelenlétében veszünk fel E/c görbét egy agonistával, ami ugyanazon jelátviteli útvonalon hat, mint a figyelmen kívül hagyott agonista, akkor az E/c görbe torzul (csökkent hatást tapasztalunk). Ez a torzulás arányos a többlet agonista koncentrációjával, ami lehetővé teszi annak meghatározását görbeillesztés segítségével. Ez a receptorális válaszkészség módszer (RRM) (Gesztelyi és mtsai, 2004; Grençzer és mtsai, 2010a, 2010b), ami többféle regressziós beállítással is elvégezhető (Szabó és mtsai, 2019b). Az RRM alkalmas a többlet agonista koncentráció által torzított E/c görbék korrekciójára is (Kiss és mtsai, 2013; Zsuga és mtsai, 2017; Erdei és mtsai, 2018; Szabó és mtsai, 2019a).

Egy RRM-mel korrigált teljes (gyakorlatilag hatástalan koncentrációval induló és jól szaturált) E/c görbének két informatív szakasza van (a korrigálatlanhoz E/c görbéhez képest): a kezdeti és a végső. A kezdeti szakasz a többlet agonista koncentráció által (kizárólag vagy túlnyomórészt) kiváltott hatás értékét mutatja (emiatt szükséges a korrekció). Az E/c görbe végső szakasza ugyanakkor a valós maximális hatás értéket jelzi, ami a korrigálatlan E/c görbén kisebb a valós értéknél (Kiss és mtsai, 2013; Zsuga és mtsai, 2017; Erdei és mtsai, 2018; Szabó és mtsai, 2019a).

3.2.5. E/c görbék empirikus jellemzése

Az E/c görbék empirikus jellemzésére az egyik legegyszerűbb és ezáltal legmegbízhatóbb kvantitatív (egzakt) receptorfunkciós modellt, a Hill-egyenletet illesztettük (Gesztelyi és mtsai, 2012). A Hill-egyenlet három empirikus paraméterrel oldja meg az E/c görbék geometriai leírását (1. egyenlet).

3.2.6. Az átlagolt CPA E/c görbék CBD okozta torzulásának kvantifikálása

Mivel a CBD több extracardialis szöveten igazoltan gátolta az ENT1-et (Carrier és mtsai, 2006; Liou és mtsai, 2008; Pandolfo és mtsai, 2011), feltételeztük, hogy a szívizom befelé irányuló adenzin transzportját is gátolva adenzin többletet halmoz fel a pitvari interstitiumban és ezáltal torzítja a CBD-kezelt obese ZDF csoport E/c görbéit. Ennek a többlet interstitialis adenzinnak a koncentrációját az RRM segítségével kvantifikáltuk két független görbeillesztési beállítás kombinációjával: az egyik az individuális vs. globális görbeillesztés, a másik a hagyományos vs. robusztus illesztés (egy korábbi vizsgálatunkban már alkalmaztunk hasonló, bár összetettebb elrendezést: Szabó és mtsai, 2019b).

Az individuális illesztés során a CBD-kezelt obese ZDF csoport átlagolt CPA E/c görbéjét a 2. egyenlettel illesztettük, ami az Obese ZDF csoport átlagolt CPA E/c görbéjének három empirikus paraméterét tartalmazta. A globális illesztés során a fent említett két csoport átlagolt CPA E/c görbéit egyszerre illesztettük a 2. egyenlettel (ezúttal variábilis empirikus paraméterekkel):

$$E' = 100 - \frac{100 \cdot \left(100 - E_{max} \cdot \frac{(c_x + c)^n}{(c_x + c)^n + EC_{50}^n}\right)}{100 - E_{max} \cdot \frac{c_x^n}{c_x^n + EC_{50}^n}} \quad (2)$$

ahol: E' : a torzult hatás (konvencionálisan meghatározva); E_{max} , EC_{50} , n : a CPA - A_1 adozin receptor - pitvari myocardium rendszer CBD-naiv állapotát leíró empirikus paraméterek (individuális illesztéskor ezeket az 1. egyenletből nyert konstans értékeken rögzítettük, míg globális illesztés során ezek a paraméterek változók voltak, mint a lentebb szereplő c_x); c : a CPA szervkádbeli koncentrációja (az E/c görbe felvételekor); c_x : hipotetikus CPA koncentráció, ami ekvifektív a CBD által okozott interstitialis adozin többlettel.

Minden további regressziós beállításnál az alapértelmezett opciót választottuk (GraphPad Software Inc.).

3.2.7. Az átlagolt CPA és adozin E/c görbék CBD által torzított hatás értékeinek korrekciója

A CBD-kezelt obese ZDF csoport átlagolt CPA és adozin E/c görbéinek hatás értékeit az individuális plusz hagyományos illesztéssel kapott c_x segítségével korigáltuk (hasonlóan a korábbi E/c görbe korrekcióinkhoz (Kiss és mtsai, 2013; Erdei és mtsai, 2018). Először az ehhez a c_x -hez tartozó hatás értéket állapítottuk meg a Hill-egyenlet segítségével:

$$E_x = E_{max} \cdot \frac{c_x^n}{c_x^n + EC_{50}^n} \quad (3)$$

ahol: E_x : a CBD által okozott interstitialis adozin többlet által kiváltott hatás; c_x : az a CPA koncentráció, amely ekvifektív a CBD által okozott interstitialis adozin többlettel; E_{max} , EC_{50} , n : az Obese ZDF csoport átlagolt CPA E/c görbéjének empirikus paraméterei (melyeket az 2. egyenlet illesztésével kaptuk).

Az E_x és a CBD-kezelt obese ZDF csoport átlagolt CPA és adozin E/c görbéinek torzított hatás értékeiből a korigált hatás értéket a 4. egyenlet segítségével számoltuk ki:

$$E = 100 - \frac{(100 - E') \cdot (100 - E_x)}{100} \quad (4)$$

ahol: E : a korigált hatás; E' : a torzult hatás; E_x : a c_x -ből számított hatás (a 3. egyenlet alapján).

A korrigált hatás értékek a CBD által okozott interstitialis adenzin többlet és az adott E/c görbe felvétele során beadott agonista (CPA vagy adenzin) együttes hatását tükrözik. Mindazonáltal a korrigált hatás értékeket a beadott agonista koncentrációk függvényében ábrázoltuk, mivel a CBD által felhalmozott interstitialis adenzin koncentrációjának pontos értékét nem tudtuk meghatározni.

3.3. Adatelemzés

Minden pitvarnak három feltételt kellett teljesítenie ahhoz, hogy eredményei bekerüljenek a vizsgálatba: (i) az első adenzin E/c görbe felvétele előtti nyugalmi kontrakciós erőnek minimum 1 mN-nak kellett lennie; (ii) az ingerelt pitvar mechanikai aktivitásának szabályosnak kellett lennie; (iii) a 10 μ M adenzin hatására bekövetkező hatás értékének a számtani közép \pm 2 SD tartományon kellett lennie (ha több mint 1 adenzin E/c görbe van, ezt a követelményt az első E/c görbétől követeltük meg). Azon preparátumok esetében számoltunk átlagot és SD-t, amelyek az első 2 kritériumnak megfeleltek.

Az adatok eloszlását Shapiro-Wilk normalitás teszttel, a varianciák homogenitását Brown-Forsythe teszttel vizsgáltuk. Ha minden adathalmaz (több, mint két adathalmaz) megfelelt a normalitás tesznek, valamint a varianciák is homogének voltak, összehasonlításukhoz Tukey utóteszttel kombinált egyszempontú varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk. Ha normális eloszlás mellett a varianciák nem voltak homogének (akár egy adathalmaz esetén is), akkor Dunnett-féle T3 utóteszttel kombinált Welch-féle ANOVA készült. Nem normális eloszlás (akár egy adathalmaz esetén is) mellett Dunn-féle utóteszttel kombinált Kruskal-Wallis tesztet használtunk. A csoportátlagok különbségét $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

A görbeillesztések során a koncentrációk (c, EC₅₀ és c_x) 10-es alapú logaritmusát vettük, az ajánlásnak megfelelően (Motulsky és mtsai, 2004).

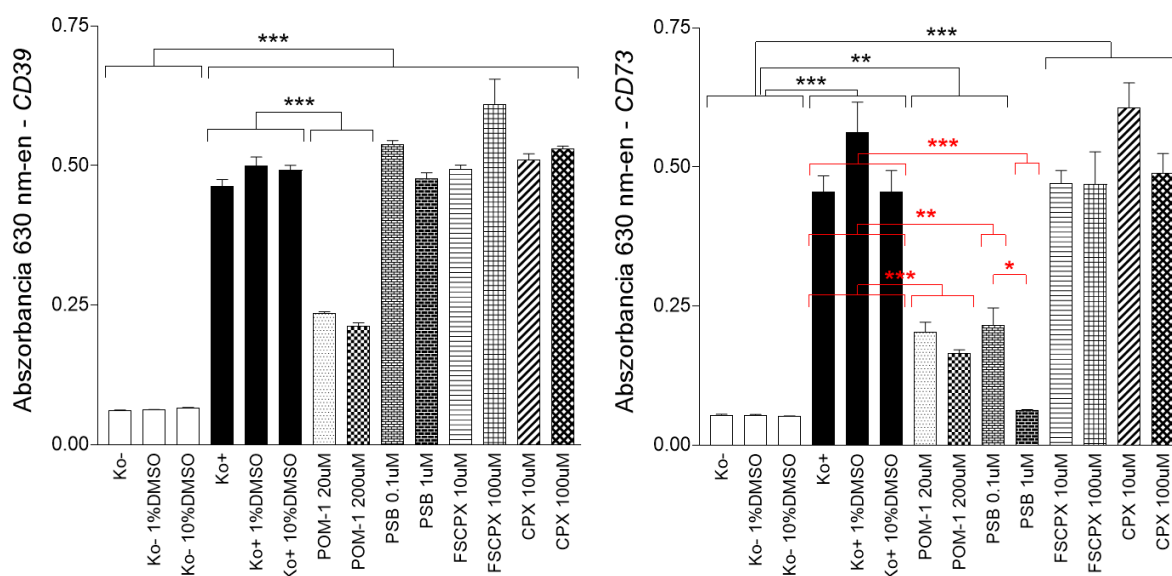
A görbeillesztést és a statisztikai elemzést GraphPad Prism 8.4.3 (686) for Windows szoftverrel (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA), míg a többi számítást Microsoft Excel 2016 (Microsoft Co., Redmond, WA, USA) segítségével végeztük.

4. Eredmények

4.1. FSCPX-szel kapcsolatos eredmények

4.1.1. CD39 és CD73 inhibitor esszék

Sem 1%-os, sem a 10%-os (v/v) DMSO nem befolyásolta jelentősen a CD39 és CD73 aktivitását (9. ábra).



9. ábra. A CD39 (bal panel) és a CD73 (jobb panel) enzimek átlagos aktivitása (+ SEM) 14 különböző reakcióelegyben. Co-: negatív kontroll (“vak”); Co- 1%DMSO: 1% DMSO-t tartalmazó negatív kontroll; Co- 10%DMSO: 10% DMSO-t tartalmazó negatív kontroll; Co+: pozitív kontroll; Co+ 1%DMSO: 1% DMSO-t tartalmazó pozitív kontroll; Co+ 10%DMSO: 10% DMSO-t tartalmazó pozitív kontroll; POM-1 20uM: 20 μ M POM-1 tartalmú inhibitor kontroll; POM-1 200uM: 200 μ M POM-1 tartalmú inhibitor kontroll; PSB 0.1uM: 0.1 μ M PSB-12379 tartalmú inhibitor kontroll; PSB 1uM: 1 μ M PSB-12379 tartalmú inhibitor kontroll; FSCPX 10uM: 10 μ M FSCPX-et tartalmazó reakcióelegy; FSCPX 100uM: 100 μ M FSCPX-et tartalmazó reakcióelegy; CPX 10uM: 10 μ M CPX-et tartalmazó reakcióelegy; CPX 100uM: 100 μ M CPX-et tartalmazó reakcióelegy. Az y tengelyen az abszorbancia értékeket ábrázoltuk 630 nm-en. POM-1: nátrium-polioxometallát; PSB: dinátrium N^6 -benzyl- α,β -methyleneadenosine-5'-diphosphate; CPX: 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine; FSCPX: 8-cyclopentyl- N^3 -[3-(4-(fluorosulfonyl)benzoyloxy)propyl]- N^7 -propylxanthine. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$

A POM-1, az ENTPDase1-3 enzimek gátlója (Müller és mtsai, 2006) (1. táblázat) és egyes P2 purinerg receptorok antagonistája (Pimenta és mtsai, 2017) jelentős, de nem teljes mértékben csökkentette a CD39 aktivitását. Érdekes módon a POM-1 a CD73-at is gátolta, legalább olyan mértékben, mint a CD39-et. (Abból kiindulva, hogy a gátlás mértéke alig csökkent a POM-1 koncentráció 20 μM -ról 200 μM -ra való növelésével, ez lehetett a POM-1 maximális gátló hatása mindkét enzimre nézve ezekben a vizsgálatokban.) A PSB-12379, a CD73-ra nemrégiben kifejlesztett inhibitor (Bhattarai és mtsai, 2015; Schmies és mtsai, 2020) viszont jelentősen csökkentette a CD73 aktivitását, amely hatás szelektív volt (nem terjedt ki a CD39-re) és 1 μM -nál teljeseedett ki. Azonban sem az FSCPX, sem a CPX nem tűnt úgy, hogy jelentősen befolyásolta volna a CD39, és a CD73 aktivitását, a beadott magas koncentrációk ellenére sem (9. ábra).

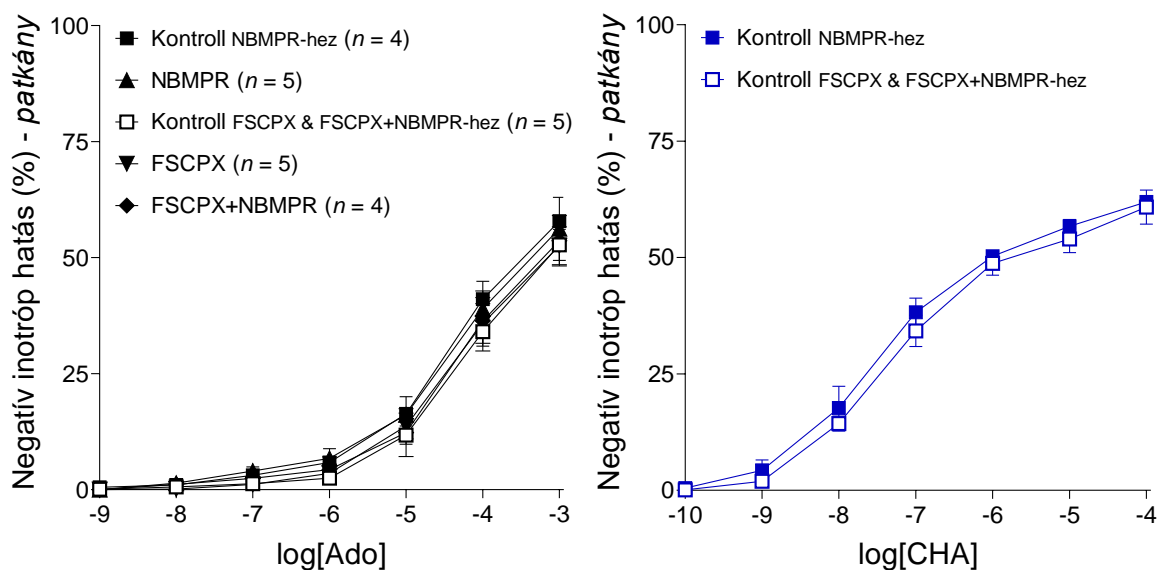
4.1.2. Az FSCPX és az NBMPR közötti interakció patkány bal pitvaron

4.1.2.1. Az adozinra adott válasz az *in vitro* kezelések előtt

Az adozin (mint nem szelektív, fiziológiás adozin receptor teljes agonista) koncentráció-függően csökkentette a patkány bal pitvari fülcsék nyugalmi kontrakciós erejét az összes vizsgálati csoportban (10. ábra, bal panel). Az adozinra adott válasz egyik koncentrációnál sem különbözött szignifikánsan a csoportok között (amelyen a kísérletek ezen szakaszában még azonos előéletűek voltak). Ez az eredmény a csoportok homogenitását jelzi a fő adozinerg mechanizmusok szempontjából (10. ábra, bal panel).

4.1.2.2. A CHA-ra adott válasz a kontroll csoportokban

A CHA (szelektív, szintetikus A_1 receptor teljes agonista) szintén koncentráció-függő módon csökkentette a patkány bal pitvari fülcsék nyugalmi kontrakciós erejét. A CHA-ra adott válaszok nem különböztek szignifikánsan a két kontroll csoport között, vagyis a protokollok időtartamának különbsége nem befolyásolta jelentősen a CHA pitvarokra gyakorolt hatását (10. ábra, jobb panel). [Azok a protokollok ugyanis, ahol FSCPX-et alkalmaztunk, lényegesen hosszabbak voltak, mint a többi. Az FSCPX-et használó és nem használó protokollok megfelelő összehasonlíthatósága érdekében egy hosszú (Kontroll FSCPX & FSCPX+NBMPR-hez) és egy rövid (Kontroll NBMPR-hez) kontroll protokollt is használtunk.]



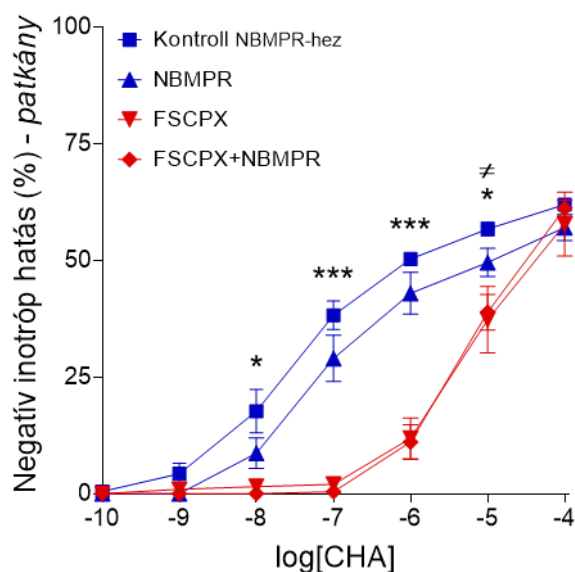
10. ábra. Az adenzin (bal panel) és a CHA (jobb panel) direkt negatív inotróp hatása izolált, ingerelt patkány bal pitvaron, az adenzinerg rendszert befolyásoló vegyszerek hiányában. A bal panel az összes csoportot mutatja, amelyeket a vizsgálat ezen szakaszáig egységesen kezeltünk (a csoportnevek a későbbi *in vitro* kezelésekre utalnak). A jobb panel a két kontroll csoportot mutatja be, amelyek két, eltérő hosszú *in vitro* kezelésen estek át. Az x tengely a CPA (szervkádbeli) moláris koncentrációjának tízes alapú logaritmusát mutatja, míg az y tengely a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenését (a 0% a kiindulási kontrakciós erőnek felel meg, a 100% a pitvarok mechanikai tevékenységének megszűnését jelenti). A szimbólumok az agonistákra adott válaszokat jelölik a csoportokon belül átlagolva (\pm SEM). A jobb panel E/c görbéihez használt kék szín megfelel a 5. ábrán látható színeknek (a kék szín az FSCPX előkezelés hiányára utal). Ado: adenzin; CHA: N^6 -cyclohexyladenosine; E/c: koncentrációhatás.

4.1.2.3. A CHA-ra adott válasz a különböző *in vitro* kezelések után

Önmagában mind az FSCPX, mind az NBMPR statisztikailag szignifikáns módon csökkentette a CHA hatását patkány bal pitvaron: az FSCPX a CHA E/c görbét jelentősen jobbra tolta anélkül, hogy csökkentette volna a maximális választ, míg az NBMPR mérsékelten csökkentette a CHA-ra adott választ, de a maximális hatást is. Az FSCPX előkezelés azonban elhanyagolhatóvá tette az NBMPR hatását a CHA-ra adott válasza: a CHA E/c görbék az FSCPX és az FSCPX+NBMPR csoportokban gyakorlatilag egybeestek (11. ábra).

Ezek a patkány pitvaron nyert eredmények megerősítik a tengerimalac pitvaron kapott hasonló eredményeinket (Erdei és mtsai, 2018) (lásd 5. ábra). Bár az FSCPX és a nitrobenziltioinozinok önmagukban kifejtett hatása a szintetikus A_1 receptor agonistákra adott válasza jelentős különbségeket mutatott a patkány és tengerimalac modellek között

(nagyságukat, de nem irányukat tekintve), az egyértelmű, hogy az FSCPX előkezelés mindkét faj pitvarában csökkentette a nitrobenziltioinozinok hatását (vö. 5. ábra, bal panel és 11. ábra).



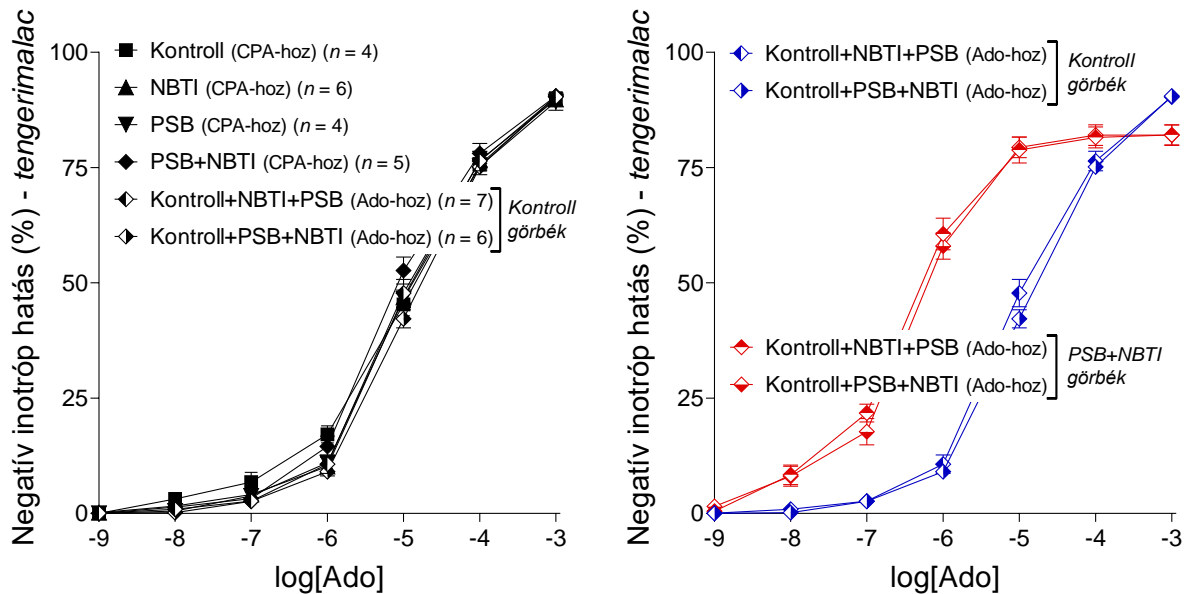
11. ábra. A CHA direkt negatív inotróp hatása izolált patkány bal pitvaron, FSCPX előkezelés nélkül és 10 μ M FSCPX előkezeléssel (kétszer beadva, a két beadás közt rövid mosással megszakítva), ezt kombinálva 10 μ M NBMPR hiányával és jelenlétével. Az egyszerűség kedvéért a Kontroll FSCPX & FSCPX+NBMPR-hez csoportot (ami nem különbözött szignifikánsan a Kontroll NBMPR-hez csoporttól) kihagytuk. Az x tengely a CHA (szervkádbeli) moláris koncentrációjának tízes alapú logaritmusát mutatja, míg az y tengely a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenését. A szimbólumok az agonistákra adott válaszokat mutatják a csoportokon belül átlagolva (\pm SEM). A kék, illetve piros E/c görbék az FSCPX előkezelés hiányára, illetve jelenlétére utalnak. FSCPX: 8-cyclopentyl- N^3 -[3-(4-(fluorosulfonyl)benzoyloxy)propyl]- N^1 -propylxanthine; NBMPR: *S*-(4-nitrobenzyl)-6-thioinosine; CHA: N^6 -cyclohexyladenosine; E/c: koncentráció-hatás; *: a Kontroll FSCPX & FSCPX+NBMPR-hez csoport (adatok nem láthatóak) összehasonlítása az FSCPX csoporttal és az FSCPX+NBMPR csoporttal (jelezve a Kontroll NBMPR-hez CHA E/c görbéjén); \neq : a Kontroll NBMPR-hez és az NBMPR csoport összehasonlítása; a jelölések száma a statisztikai szignifikancia szintjét jelenti (egy jelölés: $p < 0,05$, három jelölés: $p < 0,001$).

4.1.3. A PSB-12379 kölcsönhatása az NBTI-vel tengerimalac bal pitvarban

4.1.3.1. Az adozinra adott válasz minden csoportban

A csoportok első adozin E/c görbéit tekintve (az *in vitro* kezelések előtt) az adozin koncentrációtól függően csökkentette a tengerimalac bal pitvar nyugalmi kontraktilis erejét. Az adozinra adott válasz egyik koncentrációnál sem különbözött szignifikánsan a csoportok

között, ami bizonyítja a csoportok homogenitását az adenozinerg mechanizmusok tekintetében (12. ábra, bal panel). Hasonlóképpen, amikor összehasonlítottuk a Kontroll+NBTI+PSB (Ado-hoz) és a Kontroll+PSB+NBTI (Ado-hoz) csoportok harmadik adenozin E/c görbéit, az adenozinra adott válaszok nem különböztek szignifikánsan egyik koncentrációnál sem. A korábbi kezelések (NBTI-vel vagy PSB-12379-cel) tehát nem befolyásolták a PSB-12379-cel és NBTI-vel végzett végső együttes kezelés eredményét (12. ábra, jobb panel).



12. ábra. Az adenozin direkt negatív inotróp hatása izolált tengerimalac bal pitvaron, az adenozinerg rendszert befolyásoló vegyszerek hiányában, valamint a PSB-12379 és az NBTI együttes jelenlétében is (az "Ado-hoz" jelzéssel ellátott két csoport esetében). A bal panel az összes csoport első adenosin E/c görbéjét jelöli (a "CPA-hoz" címkével jelölt csoportok esetében ez az egyetlen adenosin E/c görbe, míg az "Ado-hoz" címkével jelölt csoportok esetében ezek az úgynevezett kontroll görbék). Az első adenosin E/c görbét produkáló pitvarokat itt még egységesen kezeltük, vagyis a csoportnevek csak a későbbi *in vitro* kezelésekre utalnak. A jobb panel az "Ado-hoz" jelölésű csoportok első és harmadik adenosin E/c görbéjét mutatja be külön-külön. Az x-tengely az adenosin moláris koncentrációjának tízes alapú logaritmusát mutatja (a szervkádban), az y-tengely pedig a hatást jelöli (a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenéseként). A szimbólumok az adenosinra adott, csoportokon belül átlagolt válaszokat jelzik (\pm SEM). A jobb panel E/c görbéihez használt színek lényegében ugyanaz, mint ami az 5. ábrán látható (a kék, illetve piros színek a PSB-12379 hiányára, illetve jelenlétére utalnak). Az "Ado-hoz" jelölésű csoportokban felvett különböző E/c görbék típusa dőlt betűvel van jelölve. E/c: koncentráció-hatás; Ado: adenosin; CPA: N^6 -cyclopentyladenosine; NBTI: *S*-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine; PSB-12379: dinátrium N^6 -benzyl- α,β -methyleneadenosine-5'-diphosphate.

Előzetes ismeretek hiányában nem volt egyértelmű, hogy egy korábbi NBTI vagy PSB-12379 kezelés befolyásolhatja-e a későbbi NBTI és PSB-12379 együttes kezelést, ezért az NBTI-vel és a PSB-12379-cel történő együttes kezelést mind az NBTI, mind a PSB-12379 kezelése után elvégeztük. Ennek megfelelően ezeket a csoportokat Kontroll+NBTI+PSB (Ado-hoz), illetve Kontroll+PSB+NBTI (Ado-hoz) csoportoknak neveztük el (12. ábra).

4.1.3.2. A CPA-ra adott válaszok a "CPA-hoz" jelzéssel ellátott csoportokban

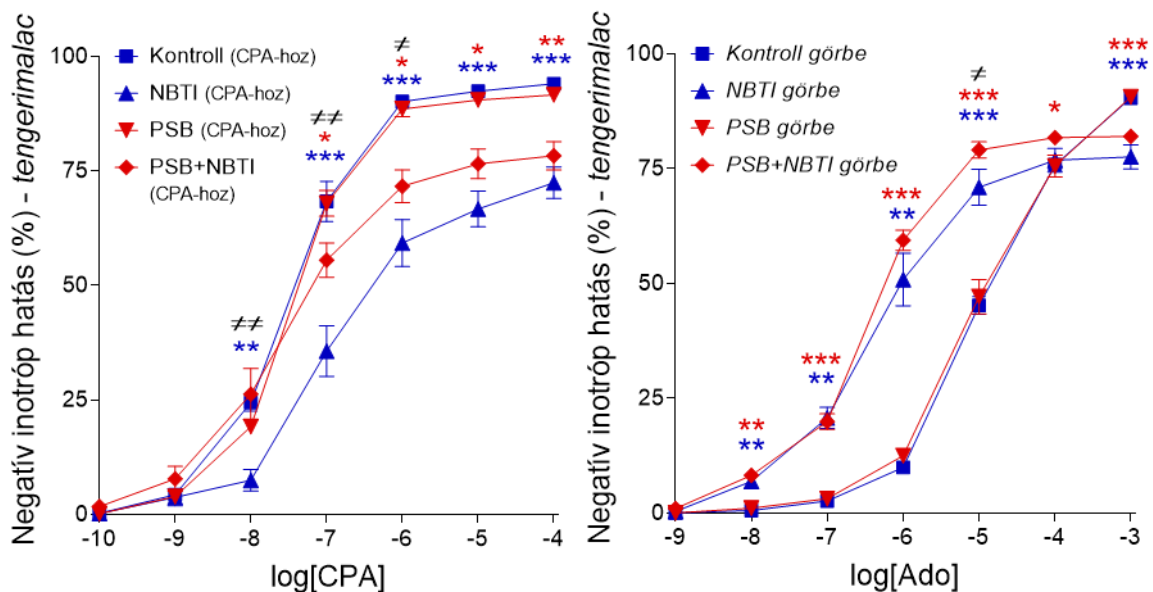
A CPA (szelektív, szintetikus teljes A_1 receptor agonista) szintén koncentrációfüggő módon csökkentette a tengerimalac bal pitvar nyugalmi kontrakciós erejét. Az NBTI hatása hasonló volt az NBMPR patkány pitvarban kifejtett hatásához és gyakorlatilag megegyezett a tengerimalac pitvarban az NBTI-vel korábban kapott eredményeinkkel (vö. 5. ábra, bal panel, 11. ábra, és 13. ábra, bal panel). A PSB-12379 (a CD73 szelektív gátlója, amelynek nincs látható hatása az A_1 -receptorra) önmagában hozzáadva nem befolyásolta jelentősen a CPA hatását, ellentétben az FSCPX-szel. A PSB-12379 azonban az FSCPX-hez hasonlóan jelentősen gátolta az NBTI hatását a CPA-ra adott válaszra. Az egyetlen különbség a PSB-12379 és az FSCPX "anti-NBTI" hatása között az, hogy előbbi gyengébb volt, mint utóbbi (vö. 5. ábra, bal panel, és 13. ábra, bal panel).

4.1.3.3. Az adenzinra adott válasz az "Ado-hoz" jelzéssel ellátott csoportokban

Az NBTI hatása gyakorlatilag megegyezett a korábbi munkáink során megfigyelt hatással (vö. 13. ábra, jobb panel és 5. ábra, jobb panel). A CPA-val kapott eredményekhez hasonlóan (13. ábra, bal panel), a PSB-12379 önmagában adva nem befolyásolta jelentősen az adenzin hatását (13. ábra, jobb panel). Fontos, hogy a CPA-val kapott eredményekkel összhangban a PSB-12379 szignifikánsan gátolta az NBTI hatását az adenzinra adott válaszra, pontosabban gátolta az NBTI úgynevezett általános (E/c görbét módosító) hatását. Ennek megfelelően a PSB-12379 az NBTI-vel együtt adva mérsékelten, de szignifikánsan növelte az adenzinra adott választ a csak NBTI jelenlétében felvett adenzin E/c görbéhez képest (13. ábra, jobb panel). Szintén összhangban a CPA-val kapott eredményekkel, a PSB-12379 ezen hatása gyengébb volt, mint az FSCPX-é (vö. 13. ábra, jobb panel és 5. ábra, jobb panel).

Összefoglalva, ezek az eredmények azt mutatják, hogy a PSB-12379, amely az interstitialis adenzin képződést korlátozta annak utolsó lépésének blokkolásával, ugyanúgy transzformálta az NBTI jelenlétében felvett CPA és adenzin E/c görbéket (13. ábra), mint az FSCPX-előkezelés, természetesen az A_1 receptor gátlás következményeit nem számítva (5. ábra). Ez a megállapítás közvetett bizonyítékot szolgáltatott az FSCPX gátló hatására a szív interstitialis

adenozin termelésére (legalábbis a patkány és tengerimalac bal pitvarban). Kísérleti körülményeinkből kiindulva az FSCPX e további hatása szintén irreverzibilisnek tűnik.

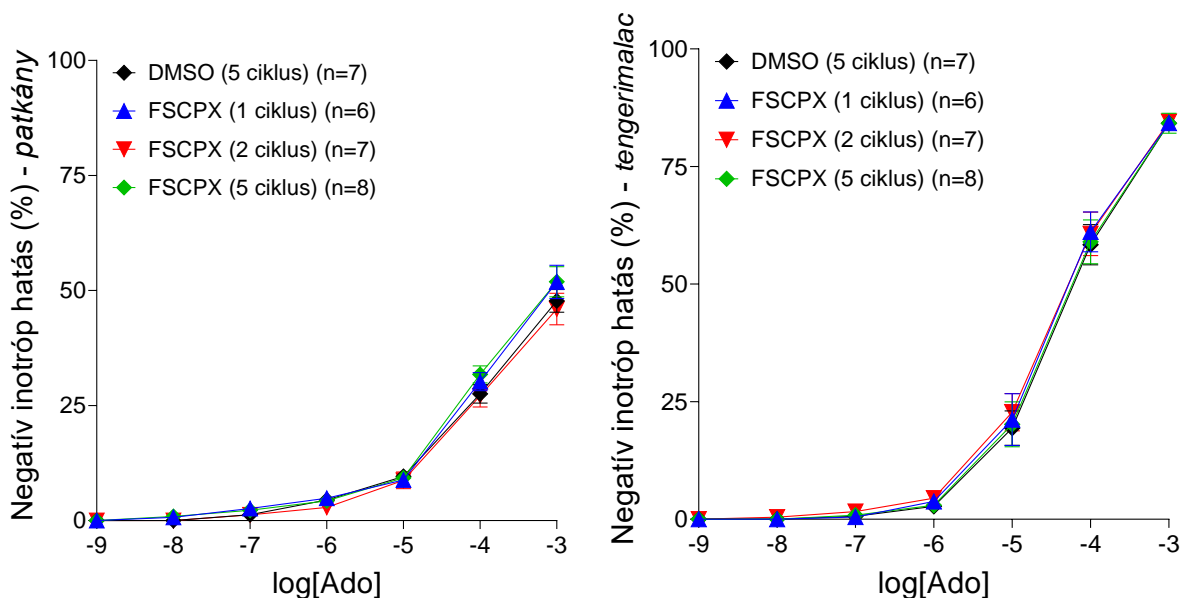


13. ábra. A CPA (bal panel) és az adenzin (jobb panel) direkt negatív inotróp hatása izolált tengerimalac bal pitvarban, 10 μ M NBTI és 3 μ M PSB-12379 hiányában és jelenlétében (minden kombinációban). Mivel sem a két kontroll görbe, sem a két PSB+NBTI görbe nem különbözött szignifikánsan egymástól (12. ábra jobb panel), ezeket a görbepárokat összevontuk (ahogy itt a jobb panelen látható). Az x tengely az adott agonista moláris koncentrációjának tízes alapú logaritmusát mutatja (a szervkádban), az y tengely pedig a hatást (a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenéseként). A szimbólumok az agonistákra adott, csoportokon belül átlagolt válaszokat jelzik (\pm SEM). A kék, illetve piros E/c görbék a PSB-12379 hiányában, illetve jelenlétében felvett görbékre utalnak. Az "Ado-hoz" jelölésű csoportok E/c görbéinek típusa dőlt betűvel van jelölve. E/c: koncentráció-hatás; Ado: adenzin; CPA: N^6 -cyclopentyladenosine; PSB-12379: dinátrium N^6 -benzyl- α,β -methyleneadenosine-5'-diphosphate; NBTI: *S*-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine; kék csillagok: a Kontroll (CPA-hoz) csoport összehasonlítása az NBTI (CPA-hoz) csoporttal (bal panel), valamint az összevont kontroll görbe összehasonlítása az NBTI-vel kezelt görbével (jobb panel); piros csillagok: a Kontroll (CPA-hoz) csoport összehasonlítása a PSB+NBTI (CPA-hoz) csoporttal (bal panel), valamint az összevont kontroll görbe összehasonlítása az összevont PSB+NBTI-vel kezelt görbével (jobb panel); \neq : az NBTI (CPA-hoz) csoport összehasonlítása a PSB+NBTI (CPA-hoz) csoporttal (bal panel), valamint az NBTI-vel kezelt görbe összehasonlítása az összevont PSB+NBTI-vel kezelt görbével (jobb panel); a jelölések száma a statisztikai szignifikancia szintjét mutatja (egy jelölés: $p < 0,05$, két jelölés: $p < 0,01$, három jelölés: $p < 0,001$).

4.1.4. Az adagolás befolyása az FSCPX-előkezelés hatására a bal pitvarokon

4.1.4.1. Az adenozinra adott válasz az *in vitro* kezelések előtt

Az adenozin koncentráció-függően csökkentette a bal pitvarok nyugalmi kontrakciós erejét, mely csökkenés nagyobb volt a tengerimalacok, mint a patkányok esetében (10 μ M adenozin koncentrációtól). Az adenozin hatása semmilyen koncentrációnál nem különbözött szignifikánsan az azonos fajhoz tartozó csoportok között. Mivel a különböző csoportok a kísérletek ezen szakaszáig ugyanolyan előéletűek voltak, ez az adenozinerg mechanizmusok homogenitását jelzi a csoportok között azonos fajon belül (14. ábra). Emellett a (Hartley típusú) tengerimalac pitvar adenozinnal szembeni nagyobb érzékenységét tapasztalhattuk (a direkt negatív inotrópia szempontjából) a (Wistar típusú) patkány pitvarhoz képest (14. ábra).



14. ábra. Az adenozin direkt negatív inotróp hatása patkányok (bal panel) és tengerimalacok (jobb panel) izolált, ingerelt bal pitvarain, négy-négy csoportra osztva, a vizsgálatnak ebben a szakaszában egységesen kezelve (a csoportnevek tehát a későbbi *in vitro* kezelésekre utalnak). Az x tengely az adenozin moláris koncentrációjának tízes alapú logaritmusát mutatja (a szerkvádban), az y tengely pedig a hatást jelöli (a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenéseként). A szimbólumok az adenozinra adott, csoportokon belül átlagolt válaszokat jelzik (\pm SEM). Ado: adenozin; DMSO: dimetil-szulfoxid; FSCPX: 8-cylopenty1- N^3 -[3-(4-(fluorosulfonyl)benzoyloxy)propyl]- N^1 -propylxanthine.

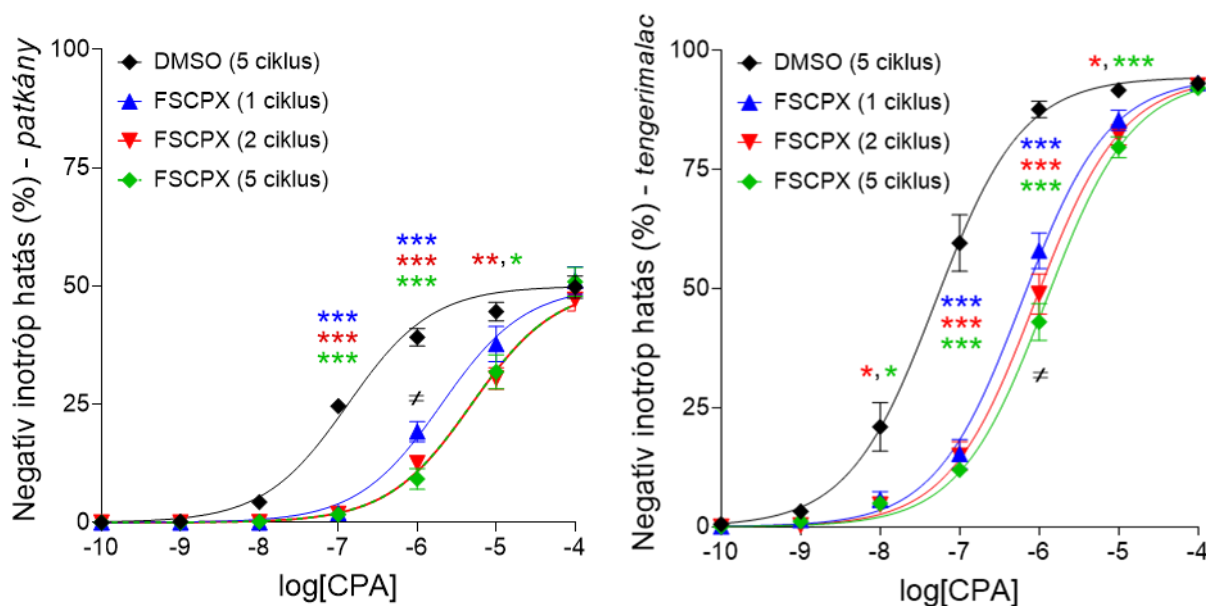
4.1.4.2. A CPA-ra adott válasz 10 μM FSCPX-szel történő *in vitro* előkezelést követően, különböző adagolási sémák alkalmazása mellett

A várakozásnak megfelelően a CPA koncentráció-függően csökkentette a pitvarok nyugalmi kontrakciós erejét. A tengerimalac bal pitvarok CPA-ra adott válasza látványosan nagyobb volt, mint a patkányoké (1 nM felett). Az FSCPX előkezelés (a pitvarok 10 μM FSCPX-vel való inkubációja 45 percig tartott, majd 75 perces kimosás következett) a CPA E/c görbék jelentős jobbra tolódását eredményezte a maximális hatás csökkenése nélkül (a DMSO-val előkezelt kontroll CPA E/c görbékkel összehasonlítva), mindkét fajban (15. ábra). Az FSCPX antagonistá hatásának nagysága azonban szignifikánsan függött az FSCPX szervkádba való beadásainak számától. Amikor az FSCPX-et csak egyszer adtuk a szervkád oldatához, az eredményezte a legkisebb antagonistá hatást mindkét faj esetében (összehasonlítva az FSCPX egynél többszöri beadásával) (15. ábra). Ami a patkány pitvarokat illeti, az FSCPX beadások számának kettőről ötre növelése már nem fokozta az FSCPX antagonistá hatását (15. ábra, bal panel). Ezzel szemben a tengerimalac pitvarokban az FSCPX ötszöri beadása (természetesen meg nem haladva a 10 μM beadáskori koncentrációt a szervkádiban) erősebb antagonistá hatást tett lehetővé, mint a kétszeri (15. ábra, jobb panel). Fontos ugyanakkor, hogy még az FSCPX ötszöri beadása sem tudta csökkenteni a CPA maximális hatását egyik fajban sem (15. ábra).

Mind a patkány, mind a tengerimalac pitvarok esetében a CPA E/c görbe adatok individuális illesztése a Hill egyenlettel (1. egyenlet) hasonló E_{max} és Hill-koefficiens (n) értékeket eredményezett, míg a $\log EC_{50}$ értékek lényegesen különböztek (delogaritmáláskor a különböző csoportok EC_{50} értékei patkányban közel két nagyságrendet, tengerimalac esetében pedig mintegy másfél nagyságrendet öleltek fel) (2. táblázat, P-i és TG-i jelzésű panelek). Ez a mintázat nagyjából megfelel a kompetitív antagonizmus megjelenésének. Mivel az FSCPX az A_1 receptor igazoltan irreverzibilis antagonistája, ez az eredmény mindkét faj pitvari szívműzében nagy A_1 receptor rezervet jelez a CPA direkt negatív inotróp hatására nézve. Ebből kiindulva az (1) egyenletet globálisan is illesztettük (megosztott E_{max} és n paraméterekkel), hogy jobban szemléltessük a különböző FSCPX adagolási sémák hatását (2. táblázat, P-g és TG-g jelzésű panelek; 15. ábra).

A patkány pitvarokban az FSCPX hatását csak az FSCPX beadások számának kettőig történő növelésével lehetett fokozni, valószínűleg az FSCPX maximális hatásának elérése miatt (2. táblázat, P-i és P-g panelek). Tengerimalac pitvaron viszont minél több FSCPX beadás (ciklus) volt egy csoport kezelési protokolljában, annál nagyobb volt az adott csoport $\log EC_{50}$

értéke (2. táblázat, TM-i és TM-g panelek). Ez összhangban vannak a különböző csoportok CPA E/c görbéinek elhelyezkedésével (15. ábra).



15. ábra. A CPA direkt negatív inotróp hatása izolált, ingerelt patkány (bal panel) és tengerimalac (jobb panel) bal pitvaron, 10 μM FSCPX előkezelés nélkül, illetve annak jelenlétében, három különböző adagolási protokoll mellett. Az x tengely a CPA moláris koncentrációjának tízes alapú logaritmusát jelöli (a szervkádiban), az y tengely pedig a hatást mutatja (a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenéseként). A szimbólumok a CPA-ra adott, csoportokon belül átlagolt válaszokat jelzik (\pm SEM), míg a vonalak a globálisan illesztett (1) egyenletet mutatják (megosztott E_{max} és n paraméterekkel; lásd a 2. táblázatot). A kék, piros, illetve zöld E/c görbék egy, két, illetve öt beadás (ciklus) melletti FSCPX előkezelési protokollt jelentenek, míg a fekete E/c görbék az FSCPX előkezelés hiányát mutatják (helyette DMSO előkezelés történt öt ciklussal). E/c: koncentráció-hatás; FSCPX: 8-cyclopentyl- N^3 -[3-(4-(fluorosulfonyl)benzoyloxy)propyl]- N^1 -propylxanthine; DMSO: dimetil-szulfoxid; CPA: N^6 -cyclopentyladenosine; *: a DMSO (5 ciklus) csoport összehasonlítása a három FSCPX-előkezelte csoporttal (az adott csoportot a csillag színe jelzi); \neq : az FSCPX (1 ciklus) csoport összehasonlítása az FSCPX (5 ciklus) csoporttal (a többi FSCPX-előkezelte csoport esetében nem kaptunk szignifikáns eredményeket); a jelölések száma a statisztikai szignifikancia szintjére utal (egy jelölés: $p < 0,05$, két jel: $p < 0,01$, három jel: $p < 0,001$)

| | DMSO (5 ciklus) | FSCPX (1 ciklus) | FSCPX (2 ciklus) | FSCPX (5 ciklus) | |
|-------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| P-i | E_{max} (%) | 47,65 (45,08 - 50,57) | 54,15 (47,92 - 64,04) | 54,53 (48,41 - 65,63) | 57,1 (49,92 - 73,19) |
| | logEC₅₀ | -6,956 (-7,105 - -6,788) | -5,558 (-5,809 - -5,209) | -5,17 (-5,391 - -4,812) | -5,123 (-5,346 - -4,689) |
| | n | 0,797 (0,632 - 1,046) | 0,739 (0,547 - 1,006) | 0,68 (0,533 - 0,852) | 0,815 (0,567 - 1,136) |
| | r² | 0,9474 | 0,9285 | 0,9526 | 0,9261 |
| P-g | E_{max} (%) | 49,99 (47,96 - 52,23) | | | |
| | logEC₅₀ | -6,879 (-7,019 - -6,73) | -5,693 (-5,836 - -5,548) | -5,311 (-5,45 - -5,173) | -5,313 (-5,446 - -5,181) |
| | n | 0,814 (0,719 - 0,926) | | | |
| | r² | 0,9431 | 0,9261 | 0,9505 | 0,9161 |
| TM-i | E_{max} (%) | 93,41 (89,19 - 97,92) | 93,92 (89,71 - 98,72) | 95,78 (90,73 - 101,9) | 96,2 (91,4 - 101,9) |
| | logEC₅₀ | -7,319 (-7,457 - -7,18) | -6,224 (-6,326 - -6,113) | -6,028 (-6,148 - -5,891) | -5,886 (-5,994 - -5,762) |
| | n | 0,819 (0,666 - 1,02) | 0,852 (0,711 - 1,026) | 0,745 (0,626 - 0,894) | 0,745 (0,636 - 0,878) |
| | r² | 0,9618 | 0,9829 | 0,9789 | 0,9812 |
| TM-g | E_{max} (%) | 94,35 (92,15 - 96,67) | | | |
| | logEC₅₀ | -7,303 (-7,398 - -7,209) | -6,218 (-6,316 - -6,119) | -6,052 (-6,146 - -5,958) | -5,917 (-6,005 - -5,828) |
| | n | 0,794 (0,727 - 0,869) | | | |
| | r² | 0,9616 | 0,9826 | 0,9787 | 0,981 |

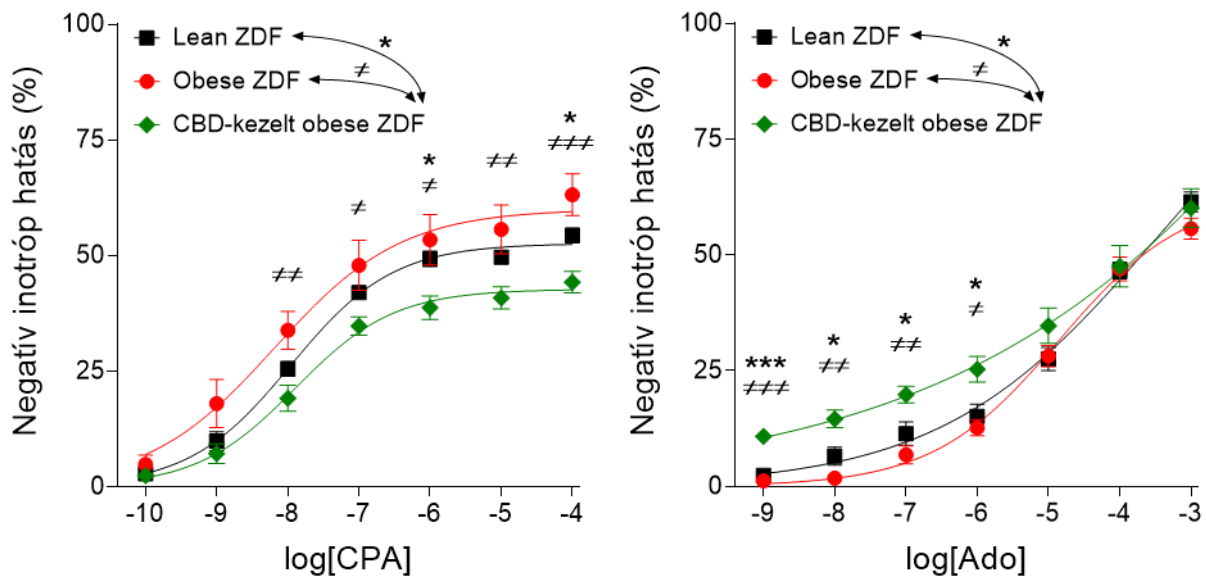
2. táblázat. A Hill-modell (1. egyenlet) paramétereit (és 95%-os megbízhatósági határait) négy csoport átlagolt CPA (*N*⁶-cyclopentyladenosine) koncentráció-hatás (E/c) adataira individuális és globális illesztés mellett patkány, valamint tengerimalac bal pitvaron. P-i: individuális illesztés patkány E/c adatokra; P-g: globális illesztés patkány E/c adatokra; TM-i: individuális illesztés tengerimalac E/c adatokra; TM-g: globális illesztés tengerimalac E/c adatokra; r²: determinációs együttható

4.2. A CBD-vel kapcsolatos eredmények

4.2.1. A CPA-ra és az adenzinra adott válasz

Mind a CPA, mind az adenzin koncentráció-függően csökkentette a pitvari kontrakciós erőt minden csoportban. Míg a CPA (viszonylag stabil, rosszul transzportálódó, szintetikus A₁

receptor agonista) a CBD-vel kezelt obese ZDF csoportban váltotta ki a leggyengébb választ (16. ábra, bal panel), addig az adenzin (gyorsan metabolizálódó és transzportálódó, fiziológias adenzin receptor agonista) éppen ebben a csoportban hozta létre a legerősebb hatást (16. ábra, jobb panel). A Lean ZDF csoportban a pitvarok CPA-ra és adenzinra adott válasza nem sokban különbözött az Obese ZDF csoportban megfigyelhető válaszoktól (16. ábra).

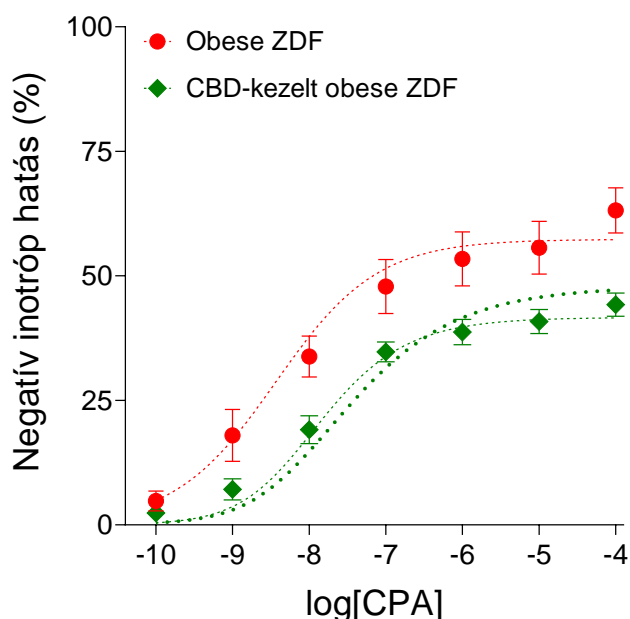


16. ábra. A CPA és az adenzin direkt negatív inotróp hatása lean és obese típusú ZDF patkányok izolált, ingerelt bal pitvarain, korábbi *in vivo* kannabidiol (CBD) vagy vivőanyag kezeléssel (ami az obese típusú ZDF patkányokat illeti). Az x tengely az adott agonista moláris koncentrációjának tízes alapú logaritmusát jelöli (a szervkádban), míg az y tengely a hatást mutatja (a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenéseként). A szimbólumok az adott agonistára adott válaszokat mutatják a csoportokon belül átlagolva (\pm SEM), a görbék pedig az illesztett Hill egyenletet (1. egyenlet). CPA: N^6 -cyclopentyladenosine ; Ado: adenzin; *: a CBD-kezelt obese ZDF csoport (n = 6) és a Lean ZDF csoport (n = 8) összehasonlítása; ≠: a CBD-kezelt obese ZDF csoport és az Obese ZDF csoport (n = 4) összehasonlítása; a jelölések száma a statisztikai szignifikancia szintjét jelenti (egy jel: p < 0,05, két jel: p < 0,01, három jel: p < 0,001)

4.2.2. A CBD által termelt interstitialis adenzin többlet

A CBD-kezelt obese ZDF csoport átlagolt CPA E/c görbe (röviden: CBD-kezelt CPA E/c görbe) torzulását az Obese ZDF csoport átlagolt CPA E/c görbéjéhez (röviden: az intakt CPA E/c görbe) képest RRM-mel határoztuk meg (17. ábra). Az individuális és globális illesztés, valamint a hagyományos és robusztus regresszió kombinációi négy c_x értéket

(ugyanakkora hatás létrehozására képes CPA koncentrációt) szolgáltatottak a CBD által okozott többlet interstitialis adenzin kvantifikálására (3. táblázat).



17. ábra. A CPA direkt negatív inotróp hatása obese típusú ZDF patkányok izolált és ingerelt pitvarain, korábbi *in vivo* kannabidiol (CBD), illetve vivőanyag kezeléssel. Az x tengely az adott agonista moláris koncentrációjának tízes alapú logaritmusát jelöli (a szervkádban), míg az y tengely a hatást mutatja (a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenéseként). A szimbólumok a CPA-ra adott válaszokat mutatják a csoportokon belül átlagolva (\pm SEM). A két vékonyabb, illetve az egyetlen vastagabb szaggatott görbe a receptorális válaszkészség módszer (RRM) globális és robusztus módon, illetve individuális és hagyományos módon illesztett modelljét (3. egyenlet) jelöli. CPA: N^6 -cyclopentiladenosine

| | Hagyományos regresszió | | Robusztus regresszió | |
|-------------------------------|------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| | intakt görbe | CBD görbe | CBD görbe | intakt görbe |
| Globális illesztés | ≈ 0 (-223) | 1,94 nmol/l (-8,712) | 3,02 nmol/l (-8,519) | ≈ 0 (-223) |
| Individuális illesztés | n.a. | 2,7 nmol/l (-8,568) | 3,2 nmol/l (-8,5) | n.a. |

3. táblázat. A receptorális válaszkészség módszer (RRM) két független regressziós beállítást kombináló illesztésével kapott c_x (illetve $\log c_x$) értékek. CBD görbe: a CBD-kezelt obese ZDF csoport átlagolt CPA koncentráció-hatás (E/c) görbéje; intakt görbe: az Obese ZDF csoport átlagolt CPA E/c görbéje; CBD: kannabidiol; CPA: N^6 -cyclopentiladenosine; ZDF: Zucker Diabetic Fatty; n.a.: nem alkalmazható

Várakozásainknak megfelelően a négy c_x érték közel áll egymáshoz, bár a globális plusz hagyományos illesztés eredménye lefelé kilóg. A három egymáshoz legközelebbi c_x érték közül az individuális plusz hagyományos illesztéssel kapott értéket választottuk ki további felhasználásra (a leginkább azért, mert a korábbi vizsgálataink során a legtöbb esetben ezt az illesztést alkalmaztuk). A globális illesztés az intakt CPA E/c görbékre is adott c_x értéket. Ezek belső kontrollként szolgáltak, mivel esetükben (a CBD hiánya miatt) nulla értéket vártunk (3. táblázat).

4.2.3. A CPA és az adenzin E/c görbék korrigált hatásai CBD-kezelt patkány pitvaron

A korrigált CBD-kezelt CPA E/c görbe körülbelül 25% hatásról indult, ami jelentős interstitialis adenzin többletet jelez CBD jelenlétében, amit az ENT1 gátlásának tulajdoníthatunk. Az *in vivo* bevitt CBD azon része, ami az *ex vivo* pitvarokban maradt, tehát „negyed-hatékony” extra adenzin koncentrációt (EC_{25}) produkált az obese típusú ZDF patkány pitvarok interstitiumában (18. ábra, bal panel).

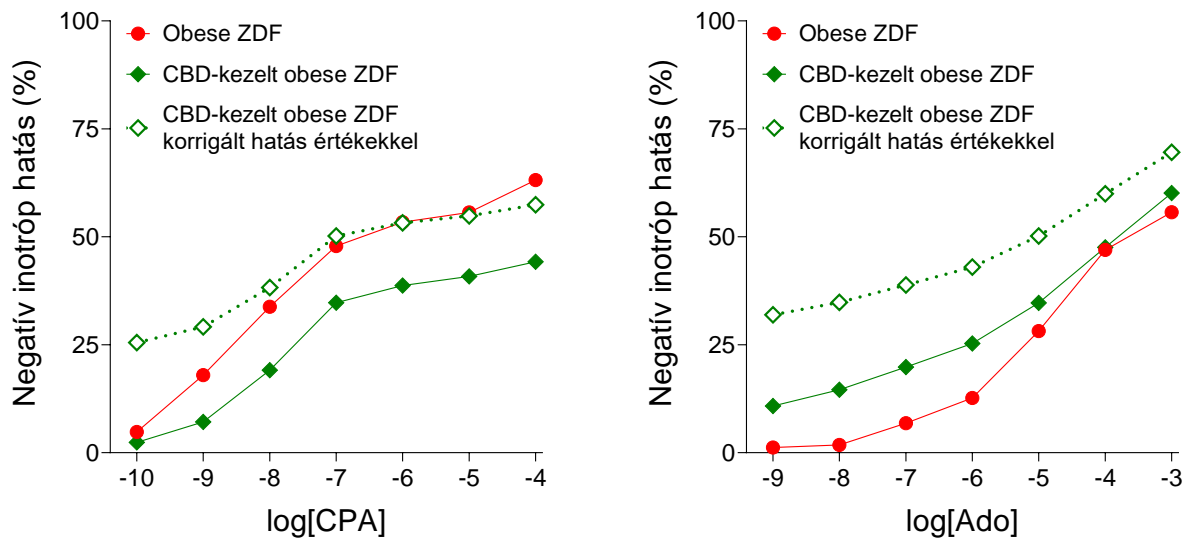
A korrigált CBD-kezelt adenzin E/c görbe első hatás értéke ugyanakkor 25% felett volt. Ez összefüggésbe hozható azzal, hogy a korrigálatlan első hatás érték eleve szokatlanul nagy, körülbelül 11% volt (18. ábra, jobb panel).

Ahogy várható volt, a korrigált CBD-kezelt CPA E/c görbe utolsó szakasza nem hordozott extra információt az intakt CPA E/c görbe utolsó részéhez képest. Kis és közepes koncentrációknál a korrigált CBD-kezelt CPA E/c görbe az intakt CPA E/c görbe felett futott, nagy koncentrációknál viszont gyakorlatilag ugyanazt a maximumot érte el (18. ábra, bal panel). A közel azonos maximum (mint várt eredmény) a felhasznált adatok megbízhatóságára utal, tehát a korrigált CBD-kezelt CPA E/c görbe utolsó szakasza belső kontrollként használható.

Ezzel szemben a korrigált CBD-kezelt adenzin E/c görbe jelentősen meghaladta az intakt adenzin E/c görbét minden koncentrációnál, beleértve a legmagasabbakat is (18. ábra, jobb panel). A CBD-kezelt adenzin E/c görbe tényleges maximuma tehát nagyobb volt, mint az intakt adenzin E/c görbéé, ami azt mutatja, hogy a CBD-kezelés növelte a pitvarok adenzinra adott maximális választát.

Mivel a szívizom A_1 adenzin receptorainak mikrokörnyezetében az interstitialis adenzin koncentráció pontos értékei ismeretlenek számunkra, a korrigált hatásértékeket csak

az exogén adenzin szervkádbeli koncentrációjának függvényében tudtuk ábrázolni (ami könnyen kiszámolható) (18. ábra).



18. ábra. A CBD-kezelt obese ZDF csoport CPA és adenzin koncentráció-hatás (E/c) görbéinek korrigált hatás értékei, valamint a korrigálatlan CPA és adenzin E/c görbék hatás értékei mindkét obese típusú ZDF patkányokat tartalmazó csoportban. Az x tengely az adott agonista moláris koncentrációjának tízes alapú logaritmusát jelöli (a szervkádban), míg az y tengely a hatást mutatja (a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenéseként). A szimbólumok az agonistákra adott válaszokat jelentik a csoportokon belül átlagolva. CPA: N^6 -cyclopentyladenosine; Ado: adenzin; CBD: kannabidiol; ZDF: Zucker Diabetic Fatty

5. Megbeszélés

5.1. Az FSCPX-re vonatkozó következtetéseink

A jelen disszertációt megalapozó vizsgálataink FSCPX-re vonatkozó eredményei számos indirekt bizonyítékot szolgáltatottak azon hipotézisünk megerősítésére, miszerint az A₁ receptor antagonizmus mellett az FSCPX-nek további hatása is van, ami által a szívben képes csökkenteni az interstitialis adenzin szintet. Emellett úgy tűnik, hogy az FSCPX a hatását a sejtmembránban fejti ki: a beadott mennyiség egy része beoldódik a membránokba, a vizes kompartmentben maradó hányad pedig gyorsan elbomlik. Mivel a CD39 (ekto-apiráz) és a CD73 (ekto-5'-nukleotidáz) enzimek ugyanúgy membránhoz kötöttek, mint az A₁ receptor, az FSCPX általunk feltételezett hatása szempontjából továbbra is a CD39 és/vagy a CD73 tűnnek a legvalószínűbb célpontoknak. Mellélelekként megállapítottuk, hogy az E-NTPDáz1-3 enzimek (ld. 1. táblázat) inhibitoraként számon tartott POM-1 vegyület a CD39 (E-NTPDáz1) mellett a CD73 enzimet is hatékonyan gátolta.

Jelen vizsgálatunk megértésének a kulcsa a 5. ábrán látható E/c görbék egymáshoz képesti elhelyezkedésének megértése. *Ex vivo* eredményeink nagyrészt E/c görbék transzformációinak elemzésén alapulnak, melyekből következtetéseket vonunk le a mögöttes mechanizmusokra vonatkozóan. A 5. ábrán az FSCPX jobbra tolta mind a CPA, mind az adenzin E/c görbét (a nekik megfelelő kontroll E/c görbékhez képest), ami az A₁ receptorok inaktivációjára utal, összhangban az FSCPX irreverzibilis A₁ receptor antagonista természetével (Gesztelyi és mtsai, 2013; Kiss és mtsai, 2013; Pak és mtsai, 2014). Az FSCPX-előkezelt E/c görbék megtartott maximális hatása nagy A₁ receptor rezervre utal a vizsgált direkt negatív inotróp hatásra vonatkozóan (Gesztelyi és mtsai, 2013; Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014), melynek esetünkben nincs különösebb jelentősége. Az NBTI (mint nitrobenziltioinozin-származék) a CPA E/c görbét jobbra tolta és csökkentette a maximális hatást. Mivel a nitrobenziltioinozinok nem antagonizálják az A₁ receptort (Thorn és mtsai, 1996; Boswell-Casteel és mtsai, 2017), ezért ez a jelenség olyan hatást jelez, ami valamilyen más módon csökkenti az A₁ receptor mediálta inotróp választ. Ezt a hatást nevezhetjük az NBTI általános E/c görbe módosító hatásának, amit az interstitialisan felhalmozódott endogén adenzinnak tulajdoníthatunk, ami pedig a sejt belseje felé történő adenzin transzport NBTI általi gátlásának köszönhető (Karsai és mtsai, 2007a, 2007b). Az NBTI hatása az adenzin E/c görbére összetettebb: az általános E/c görbe módosító hatás mellett egy specifikus E/c görbe

módosító hatás is a része. Ez utóbbi fokozza az A₁ receptor választ az exogén adenzin szint növelésével, melyet az adenzin transzport gátlása okoz, ami megvédi az exogén adenzint az intracelluláris eliminációtól.

Ha az FSCPX és az NBTI külön-külön vett hatásai egyszerűen összeadódnának, az eredő hatást tükröző E/c görbék jobbra tolódnának az NBTI-kezelt E/c görbékhez képest, de nem ezt tapasztaltuk. Ehelyett az FSCPX+NBTI E/c görbék balra tolódtak el az NBTI-kezelt görbékétől, sőt a maximális hatást tekintve még felül is múlták azokat (az alkalmazott agonistától függetlenül). Ez a jelenség interakcióra utal az FSCPX és az NBTI hatásai között. Eddigi *ex vivo* és *in silico* eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy ez az interakció az FSCPX egy korábban nem ismert hatásának tulajdonítható, melynek lényege, hogy csökkenti az NBTI általános E/c görbe módosító hatását (Erdei és mtsai, 2018; Szabo és mtsai, 2019a). Jelen vizsgálatunk célja tisztázni az FSCPX ezen hatásának mechanizmusát.

Ex vivo vizsgálataink lényege a kapcsolat keresése az E/c görbék alakja és a molekuláris háttér között: értelmezni az E/c görbék transzformációit az általunk használt vegyületek ismert hatásmechanizmusai alapján és fordítva, hatásmechanizmusokra következtetni a megfigyelt E/c transzformációkból. Ennek során a szerzett ismeretekből lépésről lépésre építettük fel (és időnként át) hipotézisünket.

Korábbi (izolált, ingerelt tengerimalac bal pitvarokon felvett) E/c görbékkel foglalkozó munkáink során azt láttuk, hogy NBTI (szelektív ENT1 gátló) jelenlétében az FSCPX (szelektív és irreverzibilis A₁ receptor antagonistaként ismert molekula) paradox módon növelte az adenzin és a CPA E/c görbék maximális hatás értékét (Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014). Ezen paradox jelenség háttérében *in silico* eredményeink alapján interferenciát feltételeztünk az FSCPX és az NBTI hatásai között (Zsuga és mtsai, 2017). További, ezzel a jelenséggel foglalkozó *ex vivo* és *in silico* eredményeink alapján azt feltételeztük, hogy az FSCPX azon túl, hogy antagonizálja az A₁ adenzin receptort, gátolja az NBTI (adenzin receptor agonisták E/c görbéire kifejtett) két hatása közül az általánosat, amit az endogén adenzin ENT1 gátlás miatti interstitialis felhalmozódása okoz (Erdei és mtsai, 2018; Szabo és mtsai, 2019a). Ennek mechanizmusaként azt feltételeztük, hogy az FSCPX csökkentheti egy vagy több, az interstitialis adenzin képződésében szerepet játszó enzim aktivitását. A két legvalószínűbb jelölt a CD39 és a CD73, mivel a szívben ez a két legfontosabb ektonukleotidáz (1. táblázat) (Borea és mtsai, 2018; Zimmermann, 2000; Fredholm és mtsai, 2001). Jelen vizsgálatunk konkrét célja e feltételezésünk igazolása vagy elvetése volt, lehetőleg az FSCPX CD39 és CD73 enzimaktivitásra kifejtett hatására vonatkozó közvetlen bizonyíték révén.

Ilyen közvetlen bizonyíték lett volna a CD39 és/vagy a CD73 FSCPX általi gátlása (vagy annak hiánya) egy megbízható *in vitro* enzimgátlási esszében. Amikor azonban olyan kiteket használtunk, melyek vizes oldatban tartalmazták az enzimeket és azok igazolt, illetve feltételezett inhibitorait, se a CD39, se a CD73 esetében nem tapasztaltunk gátló hatást az FSCPX részéről (9. ábra). Felmerült, hogy ennek oka nem a gátlás hiánya, hanem az volt, hogy az FSCPX vizes közegben gyorsan (2-3 perc alatt) elbomlik (van Muijlwijk-Koezen és mtsai, 2001). A kitekben egyébként a CPX (szelektív, reverzibilis az A₁ receptor antagonistája, ami kiindulási molekulaként szolgál az FSCPX szintéziséhez) sem bizonyult enzim inhibitornak, melyet a CPX vízbéli stabilitása miatt (von der Leyen és mtsai, 1989) megbízható eredménynek tartunk (9. ábra). Levonható tehát az a következtetés, hogy az FSCPX molekula CPX részének önmagában nem tulajdonítható ektonukleotidáz gátló hatás.

Hogy feloldjuk az ellentmondást az FSCPX *ex vivo* hatásossága és az *in vitro* hatástalansága között, kidolgoztuk azt a hipotézist, hogy beadás után az FSCPX gyorsan belép a szövetek lipid kompartmentjébe (pl. a sejtmembránokba), mialatt a vizes kompartmentben (szervkádiban lévő Krebs-oldat, interstitialis folyadék, citoszól) maradó FSCPX gyorsan elbomlik. Ily módon az FSCPX hathat azokon struktúrákon, melyek a lipid kompartmentben vagy azok felszínén helyezkednek el, mint például a membránkött fehérjék. Ismert, hogy az A₁ receptor, a CD39 és a CD73 is mind membránkött fehérjék (Zimmermann és mtsai, 2000; Fredholm és mtsai, 2001). Amennyiben hipotézisünk helytálló, az FSCPX nem vizsgálható vízbázisú kitekkel.

Vizsgálataink ezen pontján visszatértünk az *ex vivo* megközelítéshez: célunk az eredeti jelenség (az FSCPX paradoxon) megerősítése volt. Ebből kiindulva megismételtük az eredeti kísérlet legmegbízhatóbb részét (ahol szintetikus A₁ receptor agonistát használtunk) néhány módosítással: CPA helyett még stabilabb CHA-t, NBTI helyett a szélesebb körben használt NBMPR-t, tengerimalac helyett pedig az ugyancsak gyakrabban használt patkányt vettük elő. A változtatások azt a célt szolgálták, hogy kiszűrjük a korábban használt vegyületek és állatmodell előre nem látható, véletlenszerű hatását az eredményekre.

Az új kísérleteket elvégezve megállapítottuk, hogy bár a patkány CHA E/c görbék lefutása első ránézésre eléggé eltért a tengerimalac CPA E/c görbékétől (ami az FSXPX erősebb és az NBMPR gyengébb hatását mutatta a patkány pitvaron), az FSCPX paradoxon ebben a modellben is megmutatkozott. A két nitrobenziltioinozin-kezelt E/c görbét (FSCPX előkezeléssel, illetve anélkül, ugyanabban az állatmodellben) valódi kontroll görbékkel hasonlítottuk össze: a kizárólag NBMPR- és kizárólag NBTI-kezelt E/c görbéket a natív E/c

görbékkel, míg az FSCPX+NBMMPR- és FSCPX+NBTI-kezelt E/c görbét a kizárólag FSCPX-kezelt E/c görbékkel. Ez az összehasonlítás megmutatta, hogy az FSCPX előkezelés drasztikusan csökkentette az adott nitrobenziltioinozin-származék hatását az adott stabil A₁ receptor agonista E/c görbéjére (vö. 5. ábra, bal panel és 11. ábra). Mivel az NBMMPR és az NBTI hatása a stabil A₁ receptor agonisták E/c görbéjére kizárólag az általános E/c görbe módosító hatás, melyet az endogén adozin interstitialis koncentrációjának növelése mediál, továbbra is felvethető, hogy az FSCPX előkezelés csökkenti az interstitialis adozin koncentrációját. Ezek az új eredmények megerősítették az FSCPX paradoxonnal kapcsolatos korábbi eredményeinket.

Következő célunk annak kiderítése volt, hogy van-e kölcsönhatás egy nitrobenziltioinozin-származék és egy olyan szer között, ami bizonyítottan csökkenti az interstitialis adozin termelődést, de nem antagonizálja az A₁ receptort. Ezúttal a teljes eredeti kísérletünket megismételtük (lásd: 5. ábra) úgy, hogy FSCPX helyett PSB-12379-et (egy nemrégiben kifejlesztett, potens CD73 inhibitor) használtunk (Bhattarai és mtsai, 2015; Schmies és mtsai, 2020). Azt tapasztaltuk, hogy a PSB-12379 ugyanolyan módon transzformálta a CPA és az adozin E/c görbét, mint ahogy az FSCPX előkezelés tette, eltekintve az E/c görbék jobbra tolódásától, melyet az FSCPX A₁ receptor antagonist hatása okozott, és ami PSB-12379 jelenlétében elmaradt. Az NBTI általános E/c görbe módosító hatása (kisebb E_{max} és nagyobb EC₅₀) tehát gyengébb volt, amikor PSB-12379 is jelen volt a rendszerben (vö. 5. ábra és 13. ábra). Érdekes módon a 10 µM FSCPX előkezelésnek erősebb hatása volt az NBTI-kezelt E/c görbékre, mint a 3 µM PSB-12379 jelenlétének, habár már 1 µM PSB-12379 is maximális CD73 gátló hatást fejtett ki *in vitro* vizsgálatunk során (9. ábra, jobb panel). Elképzelhető, hogy az erősen lipoldékony FSCPX hatékonyabban képes gátolni a membránkötött CD73 enzimet, mint a vízdékony PSB-12379. Összefoglalva, az interstitialis adozin termelés gátlása képes utánozni az FSCPX A₁ receptor antagonizmuson kívüli hatását.

Végül arra törekedtünk, hogy alá tudjuk támasztani az FSCPX kinetikai vonatkozásaival kapcsolatos feltevésünket. Régóta ismert, hogy egy szer hatása a szervezetben kinetikai szempontból is fontos esemény mind a célpont elérése, mind a célponttal való kölcsönhatás szempontjából (van Rossum, 1977). Abból indultunk ki, hogy az FSCPX-nek csak az a része fejthet ki hatást a későbbiekben, ami a beadás után percekben belül bejut a sejtmembránba. Ha ez igaz, a 45 perces inkubáció alatt minél többször kerül beadásra az FSCPX (ugyanolyan 10 µM-os szervkádbeli koncentrációt elérve), annál nagyobb lesz a mennyisége (koncentrációja)

a sejtmembránokban (egy bizonyos határig). Megvizsgáltuk tehát az FSCPX beadásai számának hatását az FSCPX A₁ receptor antagonistá hatására izolált, ingerelt patkány és tengerimalac bal pitvaron. Eredményeink szerint az FSCPX hatása fokozható az FSCPX beadások számának növelésével. Patkány pitvaron az FSCPX hatása 2 beadás után már nem változott, tengerimalac pitvaron viszont végig (5 beadásig) nőtt (15. ábra, 2. táblázat). Ez alátámasztja feltételezésünket a sejtmembrán elsődleges szerepéről az FSCPX hatásának kifejlődése szempontjából, ami ezáltal feloldja az ellentmondást az FSCPX *ex vivo* hatékonysága és *in vitro* hatástalansága között (a CD39 és/vagy CD73 gátló hatást tekintve). Az FSCPX ezen kinetikai sajátossága érthetővé teszi azt is, hogy miért is olyan nehéz ezen vegyület hatásmechanizmusát tanulmányozni.

Mindent összevetve, egyetlen közvetlen bizonyíték helyett három közvetett bizonyítékot szereztünk az FSCPX azon feltételezett hatására vonatkozóan, hogy csökkenti a nukleozid transzport gátlók interstitialis adenzin felhalmozódást okozó hatását. Az FSCPX ezen hatásának mechanizmusát csak további vizsgálatokkal lehet pontosítani. Az eddigi eredményeink alapján mindazonáltal feltételezhetjük, hogy az FSCPX membránkött célpontokat befolyásol, melynek eredményeként képes csökkenteni az interstitialis adenzin termelődését a myocardiumban. Az FSCPX előkezelést követő hosszú (75 perces) kimosási periódus alapján az FSCPX hatásai irreverzibilisnek tűnnek, bár nem zárható ki valamennyi FSCPX membránokban való perzisztálása (sőt, inkább valószínű). Az ok, ami miatt az FSCPX (általunk feltételezett) második hatása csak a nukleozid transzport gátlása során nyilvánul meg, az, hogy még a nyugalmi interstitialis adenzin szint is túl alacsony ahhoz, hogy észrevehető negatív inotróp hatást váltson ki, nem beszélve annak csökkenéséről (Pák és mtsai, 2015). Emiatt csak olyan körülmények között vagyunk képesek az FSCPX fent említett hatását kimutatni, amelyek jelentősen megnövelik az endogén adenzin interstitialis koncentrációját (mint például a nukleozid transzport gátlása). Legjobb tudomásunk szerint jelenleg a mi kísérleti megközelítésünk az egyetlen olyan *ex vivo* rendszer, ami lehetővé tette az FSCPX paradoxon felismerését és vizsgálatát.

5.2. A CBD-re vonatkozó következtetéseink

A jelen értekezést megalapozó vizsgálataink CBD-re vonatkozó eredményei - legjobb tudomásunk szerint - először szolgálnak funkcionális bizonyítékkal a CBD szívizomban kifejtett adenzin transzport gátló hatásáról, emellett először zárják ki az adenzin receptor agonista sajátosságot a CBD számottevő tulajdonságai közül. A CBD tartós, orális adagolása

szignifikánsan növelte obese típusú ZDF patkányok izolált, ingerelt bal pitvarainak adozinra adott választát, ami arra utal, hogy CBD alkalmazása mellett a szívben tartósan fokozott adozinerg védelem van jelen a metabolikus szindrómára jellemző körülmények között is.

A CBD ígéretes, nem bódító hatású fitokannabinoid, melynek széles körben vizsgálják gyulladásgátló, daganatellenes, neuroprotektív, görcsoldó, szorongásoldó, antipszichotikus, antidepresszáns és antidiabetikus tulajdonságait (Bielawiec és mtsai, 2020; Sunda és mtsai, 2020; Kicman és Toczek, 2020; Bilbao és mtsai, 2022; Peng és mtsai, 2022). A CBD ráadásul kereskedelmi forgalomban van mint étrend-kiegészítő, így már csak ezért is fontos feltárni hosszú távú használatának lehetséges következményeit. Különös figyelmet kell fordítani a létfontosságú, de érzékeny szervekre, mint a szív, illetve az alapvető protektív mechanizmusokra, mint amilyen az adozinerg rendszer is. Ennek megfelelően a most ismertetett vizsgálataink során arra a hatásra összpontosítottunk, amelyet a hosszú távú orális CBD kezelés képes kifejteni a szívizom adozinerg rendszerére, amely utóbbi működését a pitvarra jellemző robusztus direkt negatív inotróp hatás mérésével (Fredholm és mtsai, 2001; Belardinelli és mtsai, 2015) követtük. A szívizomban az adozin legtöbb hatását, beleértve a direkt negatív inotrópiát is, az A₁ receptor közvetíti (Fredholm és mtsai, 2001; Szentmiklosi és mtsai, 2011; Headrick és mtsai, 2013; Belardinelli és mtsai, 2015; Lasley, 2018).

A CPA (viszonylag stabil, rosszul transzportálódó, szintetikus A₁ receptor teljes agonista) szignifikánsan kisebb választ váltott ki a CBD-kezelt, obese típusú ZDF patkányokból izolált pitvarokban, mint a vivőanyaggal kezelt obese típusú ZDF patkányok pitvaraiban (16. ábra, bal panel). Ezzel szemben az adozin (gyorsan metabolizálódó és transzportálódó, fiziológiás adozin receptor teljes agonista) szignifikánsan nagyobb választ váltott ki a CBD-kezelt pitvarokban, mint a vivőanyaggal kezeltekben, igaz, ez csak alacsony és közepes koncentrációknál volt megfigyelhető (16. ábra, jobb panel). Munkacsoportunk korábbi tapasztalatai szerint ez a mintázat jellemző arra az állapotra, amikor a szívizom adozin transzportja gátolva van (Karsai és mtsai, 2006; Kiss és mtsai, 2013; Erdei és mtsai, 2018; valamint a jelen disszertációt megalapozó első vizsgálatunk). Ennek oka, hogy megfelelő oxigénellátás esetén a szívizom adozin transzportja a sejtekbe irányul, így gátlása növeli az endogén adozin interstitialis szintjét (Deussen és mtsai., 1999, 2006; Karsai és mtsai., 2006). Ez a többlet interstitialis adozin elhasználja az adozin receptorok válaszadási kapacitásának egy részét még azelőtt, hogy E/c görbét vennék fel a rendszerben (Gesztelyi és mtsai., 2004; Greczer és mtsai, 2010a). Ennélfogva egy rosszul transzportálódó adozin receptor agonista (pl. CPA) nem tud akkora hatást kiváltani ebben a rendszerben, mint

amikorát egy intakt rendszerben (amelyben az adenosin transzport ép) kiválthatna. Egy gyorsan metabolizálódó és transzportálódó adenosin receptor agonista (pl. adenosin) esetében viszont két ellentétes hatás érvényesül: a fent említett torzító hatás, ami csökkenti a választ, és egy másik hatás, ami fokozza a választ. Ennek mechanizmusa az, hogy a transzport gátlása megvédi ezt a metabolizálható és szállítható exogén agonistát az intracelluláris eliminációtól.

E két ellentétes hatás eredőjeként a kis és közepes agonista koncentrációkra fokozott válaszok, a nagy agonista koncentrációkra csökkent vagy változatlan válaszok alakulnak ki. Ezt figyeltük meg korábbi, tengerimalac és patkány pitvarokon végzett vizsgálataink során, ahol nitrobenziltioinosin származékokat használtunk az adenosin transzport gátlására, miközben adenosint alkalmaztunk jól metabolizálódó és transzportálódó exogén agonistaként (Karsai és mtsai, 2006, 2007; Kiss és mtsai, 2013; Pák és mtsai, 2014; Erdei és mtsai, 2018; valamint a jelen disszertációt megalapozó első vizsgálatunk). A most ismertetett vizsgálatban is ezt tapasztaltuk a CBD-vel kezelt pitvarok esetén: gyengébb választ kaptunk minden CPA-koncentrációra (16. ábra, bal panel), míg a kis és közepes adenosin koncentrációkra erősebb, a nagy adenosin koncentrációkra pedig változatlan válaszokat (a vivőanyaggal kezelt pitvarokhoz képest) (16. ábra, jobb panel).

A kutatások szerint a CBD hatékonyan gátolja az ENT1-et (Carrier és mtsai, 2006; Liou és mtsai, 2008; Pandolfo és mtsai, 2011). Ez a hatás erős, koncentráció-függő és már viszonylag kis CBD koncentrációnál (100 nM) kialakul (Carrier és mtsai, 2006; Ibeas Bih és mtsai, 2015). Eddig neuronokban (Pandolfo és mtsai, 2011), makrofágokban, valamint retina és agyi mikroglia sejtekben (Carrier és mtsai, 2006; Liou és mtsai, 2008) mutatták ki, de a szívben korábban még nem. Jelen kutatásunk az első, amely funkcionális bizonyítékot szolgáltat a CBD adenosin transzport gátló hatásáról a szívizomban.

Mivel az adenosin minden típusú adenosin receptort aktivál, a szív A_{2A} adenosin receptorának esetleges érintettségét sem lehet figyelmen kívül hagyni. Az A_{2A} adenosin receptor, elsősorban az adenilát-cikláz stimulálásával, növelheti a kontraktilis erőt (Boknik és mtsai, 2021). Ha a CBD képes lenne gyengíteni az A_{2A} adenosin receptor funkcióját (vagy annak jelátvitelét), ez a mechanizmus hozzájárulhatna az adenosin erősebb negatív inotróp hatásához a CBD kezelés után, amit a jelen tanulmányban is megfigyeltünk (16. ábra, jobb panel). Legjobb tudomásunk szerint azonban még nem írtak le olyan eredményt, ami erre utalna. Hasonlóképpen, (pl. lásd az 3. táblázatot Kicman és Toczek, 2020-ban), eddig nem találtunk bizonyítékot a CBD azon hatásáról, ami az adenosinhoz kapcsolódó enzimek aktivitását befolyásolná. Továbbá, ha figyelembe vesszük a CBD elképzelhető hatásait a

szívizom adenzinerg rendszerére a nukleozid transzporton kívül, egyik sem magyarázza azt a megfigyelésünket, hogy a CBD ellentétes hatást gyakorolt az adenzin és a CPA által kiváltott válaszokra (16. ábra).

A CBD ENT1 gátló hatásának kellően látványos és meggyőző kimutatásához némi transzformációt tartottunk szükségesnek a CBD-vel kezelt állapotot reprezentáló E/c görbéken. Mint fentebb említettük, ha figyelmen kívül hagyjuk az interstitialis adenzin többlet, az torzítani fogja az adenzin receptor agonisták hagyományosan kiértékelt és ábrázolt E/c görbét (oly módon, hogy virtuális csökkenést okoz az ezen agonistákra adott válaszban, ami - a körülményektől függően - lehet látványos vagy alig észrevehető is). Ez a torzítás félreértelmezésekhez vezethet, amikor az érintett E/c görbét torzítatlan (intakt) E/c görbékkel hasonlítjuk össze. Korábban kidolgoztunk egy módszert, amellyel ez az E/c görbe torzulás korrigálható (Kiss és mtsai, 2013; Erdei és mtsai, 2018). Ezzel olyan E/c görbe hatás értékeket számolhatunk ki, amelyek információt adnak a torzulás okának nagyságáról (ld. a korrigált E/c görbe kezdeti része), továbbá a valós válaszkészségről (ld. a korrigált E/c görbe végső része).

A korrigált CBD-kezelt CPA E/c görbe kb. 25% hatásról indult, ami azt jelzi, hogy a CBD legkevesebb az adenzin EC₂₅ értékét halmozta fel a szívizom A₁ receptorainak mikrokörnyezetében (18. ábra, bal panel). A korrigált CBD-kezelt adenzin E/c görbe végső része pedig lényegesen erősebb maximális választ mutat, mint kontroll megfelelője (18. ábra, jobb panel). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a hosszú távú orális CBD kezelés folyamatos, mérsékelten emelkedett adenzinerg aktivitást tart fenn a szívben, emellett fokozza az adenzinra adott választ (ez az adenzin lehet exogén, de endogén is, mint a szívizom interstitiumában adenzin felszabaduláshoz vezető ingerekre adott válasz).

Meg kell jegyezni, hogy korrekciós módszerünk minden válaszcsökkenést egy extra, figyelembe nem vett agonista koncentrációnak tulajdonít (17. ábra). Az adenzin többlet krónikus jelenléte miatt azonban az A₁ receptor downregulációjának és/vagy deszenzitizációjának kérdésével is foglalkoznunk kell. Egy korábbi munkánkban azt találtuk, hogy a szívizom A₁ receptor érzékenysége nem csökkent az *ex vivo* kísérleteink időablakában (Gesztelyi és mtsai, 2004). Ez összhangban van mások azon eredményeivel, miszerint az A₁ receptor lassan deszenzitizálódik, még jelentős mennyiségű teljes agonista jelenlétében is több hét szükséges hozzá (Willems és mtsai, 2006; Mundell és Kelly, 2011). Ebből kiindulva korábbi vizsgálatainkban, melyek az adenzin transzport gátlásának akut következményeivel foglalkoztak (Karsai és mtsai, 2006; Kiss és mtsai, 2013; Erdei és mtsai, 2018; továbbá a jelen

disszertációt megalapozó első vizsgálatunk), nem feltételeztük az A₁ receptor (valós) válaszkészségének csökkenését.

A jelen vizsgálatunkban alkalmazott négyhetes CBD kezelés azonban elég hosszú ahhoz, hogy mérlegelnünk kelljen az A₁ receptor deszenzitizációjának következményeit. Ha volt deszenzitizáció, akkor a négyhetes CBD kezelés után az adozinra adott válasz kisebb volt, mint amit a korrigált adozin E/c görbe mutat (18. ábra, jobb panel). Ennek oka, hogy deszenzitizált receptorokon a válasz csökkenése részben a receptor deszenzitizációjából fakad, így a korrekciós módszer túlbecsüli az agonista többlet koncentrációját, ami a torzult E/c görbe túlkorrekciójához vezet. Ha azonban rátekintünk a hagyományosan kiértékelt adozin E/c görbékre (16. ábra, jobb oldal), láthatjuk, hogy a hosszú távú CBD kezelés vitathatatlanul növelte az adozinra adott választ 1 nM-tól 10 µM-ig, ami kardioprotektív szempontból fontos koncentráció-tartomány (Headrick, 1996; Lasley és Mentzer, 1998). Ebből következően a hosszú távú orális CBD kezelés mindenképpen növelte a szív adozinerg jelátvitelét, még akkor is, ha a szívizom A₁ adozin receptorai bizonyos fokú downreguláción és/vagy deszenzitizáción mentek keresztül.

Az a megfigyelés, hogy a CBD jelenléte a szívben A₁ receptor aktivációhoz vezetett (Gonca és mtsai, 2015), felvetette annak lehetőségét, hogy a CBD A₁ receptor agonistaként működhet (Drugbank-2). Ha ez így van, akkor a CBD kezelt patkányok szívizomzatába kerülő CBD nem csak adozin többletet hoz létre, hanem maga is A₁ receptor agonista többletet jelent. Ennek alapján a CBD-nek, mint A₁ receptor agonista többletnek, csökkentenie kellett volna mind a CPA-ra, mind az adozinra adott választ (a 16. ábra hagyományosan kiértékelt és ábrázolt E/c görbéin). Egy A₁ receptor agonista többlet (ami már az E/c görbe felvétele előtt jelen van, de amit figyelmen kívül hagytunk) nem növelheti az adozinra (vagy bármely más adozin receptor agonistára) adott választ (sem a virtuálisat, sem a valósat). Jelen vizsgálatunkban azonban az *in vivo* CBD kezelés csak a CPA-ra adott választ csökkentette, az adozinra adott választ növelte (a virtuálisat is: 16. ábra, a valósat is: 18. ábra). Ebből következően a mi kísérleti körülményeink között a CBD inkább adozin transzport gátlóként, mint adozin receptor agonistaként viselkedett. Ez az eredmény funkcionális bizonyítékot jelent annak a kérdésnek az eldöntésében, hogy az adozin transzport gátló vagy az adozin receptor agonista tulajdonság uralja-e a CBD adozinerg hatását a szívizomban.

Meg kell említenünk, hogy a vizsgálathoz használt állatok a feláldozásuk előtt számos *in vivo* vizsgálaton estek át (a részleteket lásd az Anyagok és módszerek fejezetben), ami bizonyos mértékig zavarhatta a méréseinket. Emellett a vizsgálathoz használt, CBD-ben gazdag

kenderből készült olaj más bioaktív fitokemikáliákat is tartalmazott, amelyek hatásai szintén befolyásolhatták eredményeinket. A gyártó szerint ez a termék a CBD (16,802% w/w) mellett kannabidivarin (0,038% w/w) tartalmaz, illetve a kimutathatósági küszöb alatt más fitokannabinoidokat is (CBD, 2021). Mások eredményei alapján a kannabigerol, kannabikromén, Δ^8 - és Δ^9 -tetrahidrokannabinolok, kannabinol, kannabiciklol (és ezek 3'-karboxiszármazékai "savakként"), továbbá kannflavinok, β -mircén és β -kariofillén lehetnek ezek a további összetevők (Morales és mtsai, 2017; Pellati és mtsai, 2018; Ohtsuki és mtsai, 2022). Ezek mindegyike antioxidáns, legtöbbjük gyulladáscsökkentő, néhányuk pedig feltehetően neuroprotektív is (Morales és mtsai, 2017; Scandiffio és mtsai, 2020; Pannico és mtsai, 2022). Érdekes tény ugyanakkor, hogy a CBD-ben gazdag kivonatok kedvezőbbnek mutatkoznak a tisztított CBD termékeknél mind a jótékony, mind a nemkívánatos hatások tekintetében (Millar és mtsai, 2020).

Meg kell jegyezni, hogy a jelen vizsgálat eredményei azon a feltételezésen alapulnak, hogy az *in vivo* beadott CBD elegendő mennyiségben volt jelen a pitvarokban ahhoz, hogy az *ex vivo* kísérletek során gátolni tudja az ENT1-et. Ezt a feltételezésünket a CBD erősen lipofil természete indokolja. A jelen értekezést megalapozó előző vizsgálatunkban az FSCPX (szintén erősen lipofil anyag) felhalmozódott és elegendő mennyiségben bent maradt az izolált pitvarok lipid kompartmentjében (pl. a sejtmembránokban) ahhoz, hogy képes legyen hosszú ideig hatást kifejteni. Ez alapján okkal feltételezhetjük, hogy az *in vivo* bejuttatott CBD elég hosszú ideig képes a pitvarokban perzisztálni ahhoz, hogy a transzmembrán ENT1-re *ex vivo* gátló hatást gyakorolhasson.

6. Az új eredmények összefoglalása

A jelen értekezést megalapozó első vizsgálatunkban a munkacsoport korábbi *ex vivo* kísérletei során észlelt FSCPX paradoxont teszteltük, mely szerint a szelektív A₁ receptor antagonistá FSCPX - gátolt nukleozid transzport mellett - növelte az A₁ receptor agonisták E/c görbéin ábrázolódó maximális direkt negatív inotróp hatást izolált, ingerelt tengerimalac bal pitvaron. *In silico* eredmények alapján feltételeztük, hogy az FSCPX csökkenti az endogén adenzin nukleozid transzport gátlás okozta interstitialis felhalmozódását, melynek háttérében az interstitialis adenzin előállításáért leginkább felelős két enzim, a CD39 és/vagy a CD73 gátlása állhat. Hipotézisünk igazolására három indirekt bizonyítékot találtunk: (i) igazoltuk az FSCPX paradoxon reprodukálhatóságát másik állatmodellen, másik A₁ receptor agonistával és másik nukleozid transzport gátlóval; (ii) igazoltuk az FSCPX paradoxon utánozhatóságát olyan CD73 inhibitorral, ami nem A₁ receptor antagonistá; (iii) igazoltuk az FSCPX erős lipofiliáját, ami egyrészt oka lehetett a vizes alapú CD39 és CD73 inhibitor esszék sikertelenségének, másrészt megmagyarázza az FSCPX *ex vivo* hatékonyságát oly módon, hogy a gátló (antagonista, illetve inhibitor) hatásokért a membránokba oldódott FSCPX-et felelősségét veti fel. Ez a három indirekt bizonyíték együtt elég meggyőző ahhoz, hogy továbbra is feltételezzük, hogy az FSCPX gátolja az interstitialis adenzin termelést.

A jelen értekezést megalapozó második vizsgálatunkban a hosszú távú, orális CBD kezelés hatását tanulmányoztuk obese típusú ZDF patkányok izolált, ingerelt bal pitvarainak adenzinerg rendszerére. A CBD csökkentette egy stabil, rosszul transzportálódó A₁ receptor agonista direkt negatív inotróp hatását, ugyanakkor növelte a gyorsan metabolizálódó és transzportálódó adenzin direkt negatív inotróp hatását. Legjobb tudomásunk szerint ez az eredmény az első bizonyíték a CBD adenzin transzport gátló hatására a szívizomban, ami arra utal, hogy hosszú távú, orális CBD kezeléssel a szívet tartósan fokozott adenzinerg védelemben lehet tartani a 2-es típusú diabetes mellitusra jellemző körülmények között is. Eredményeink azt is alátámasztják, hogy a CBD adenzinerg aktivációt kiváltó, illetve fokozó hatásáért döntően (vagy kizárólag) a nukleozid transzport gátló tulajdonsága a felelős, és valószínűtlen, hogy a CBD érdemleges mértékű közvetlen A₁ receptor izgató sajátossággal rendelkezne.

7. Summary of the findings

In our first investigation underlying the present thesis, we examined a phenomenon called FSCPX paradox that has been detected during previous *ex vivo* studies of our work team. According to this paradox, FSCPX, a selective A₁ receptor antagonist, increased the maximal direct negative inotropic effect, shown in the E/c curves of A₁ receptor agonists, in the isolated, paced guinea pig left atrium, under nucleoside transport blockade. Based on *in silico* results, we hypothesized that FSCPX reduces the interstitial accumulation of endogenous adenosine during nucleoside transport inhibition, which may be due to an inhibition of CD39 and/or CD73, the two main enzymes responsible for the production of interstitial adenosine in the heart. We found three indirect pieces of evidence to prove our hypothesis: (i) we have confirmed the reproducibility of the FSCPX paradox in another animal model using another A₁ receptor agonist and another nucleoside transport inhibitor; (ii) we have confirmed the imitability of the FSCPX paradox using a CD73 inhibitor lacking of A₁ receptor antagonist property; (iii) we have confirmed the strong lipophilicity of FSCPX, which could be the reason for the failure of water-based CD39 and CD73 inhibitor assays, and it can also explain the *ex vivo* effectiveness of FSCPX in a way that it suggests that the fraction of FSCPX, which enters the membranes, is responsible for the blunting (antagonistic and inhibitory) effects. These three pieces of indirect evidence together are convincing enough to continue to assume that FSCPX inhibits the interstitial adenosine production.

In our second investigation underlying the present thesis, we studied the effect of a long-term, oral CBD treatment on the adenosinergic system of isolated, stimulated left atria of obese-type ZDF rats. CBD reduced the direct negative inotropic effect of a stable, poorly transported A₁ receptor agonist; however, it increased the direct negative inotropic effect of the rapidly metabolized and transported adenosine. To the best of our knowledge, this result is the first evidence of the inhibitory effect of CBD on the adenosine transport in the myocardium, which suggests that, with long-term, oral CBD treatment, the heart can be kept under permanently enhanced adenosinergic protection even under the conditions typical of type 2 diabetes mellitus. Our results also support that the inhibitory property of nucleoside transport is mainly (or exclusively) responsible for inducing or enhancing adenosinergic activation, an effect evoked by CBD, and that it is unlikely that CBD has a direct A₁ receptor stimulatory property to a significant extent.

8. Irodalom

8.1. A disszertáció elkészítéséhez felhasznált irodalom

1. Abbracchio, M.P.; Burnstock, G.; Boeynaems, J.M.; Barnard, E.A.; Boyer, J.L.; Kennedy, C.; Knight, G.E.; Fumagalli, M.; Gachet, C.; Jacobson, K.A.; Weisman, G.A. International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G protein coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol. Rev.* 2006, 58, 281–341, doi: 10.1124/pr.58.3.3
2. Alnouri, M.W.; Jepards, S.; Casari, A.; Schiedel, A.C.; Hinz, S.; Müller, C.E. Selectivity is species-dependent: Characterization of standard agonists and antagonists at human, rat, and mouse adenosine receptors. *Purinergic Signal.* 2015, 11, 389–407, doi:10.1007/s11302-015-9460-9
3. Antonioli, L.; Fornai, M.; Pellegrini, C.; Pacher, P.; Haskó, G. Adenosine signaling as target in cardiovascular pharmacology. *Curr Opin Pharmacol.* 2023, 71:102393, doi: 10.1016/j.coph.2023.102393
4. Arzimanoglou, A.; Brandl, U.; Cross, J.H.; Gil-Nagel, A.; Lagae, L.; Landmark, C.J.; Specchio, N.; Nabbout, R.; Thiele, E.A.; Gubbay, O. The Cannabinoids International Experts Panel; Collaborators. Epilepsy and cannabidiol: a guide to treatment. *Epileptic Disord.* 2020, 22(1), 1-14, doi: 10.1684/epd.2020.1141
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. Bhattarai, S.; Freundlieb, M.; Pippel, J.; Meyer, A.; Abdelrahman, A.; Fiene, A.; Lee, S.Y.; Zimmermann, H.; Yegutkin, G.G.; Sträter, N.; El-Tayeb, A.; Müller, C.E. α,β -Methylene-ADP (AOPCP) Derivatives and Analogues: Development of Potent and Selective ecto-5'-Nucleotidase (CD73) Inhibitors. *J. Med. Chem.* 2015, 58, 6248–6263, doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00802
7. Bielawiec, P.; Harasim-Symbor, E.; Chabowski, A. Phytocannabinoids: Useful Drugs for the Treatment of Obesity? Special Focus on Cannabidiol. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2020, 11, 114, doi:10.3389/fendo.2020.00114
8. Bilbao, A.; Spanagel, R. Medical cannabinoids: a pharmacology-based systematic review and meta-analysis for all relevant medical indications. *BMC Med.* 2022, 20, 259, doi:10.1186/s12916-022-02459-1
9. Boknik, P.; Eskandar, J.; Hofmann, B.; Zimmermann, N.; Neumann, J.; Gergs, U. Role

of Cardiac A2A Receptors Under Normal and Pathophysiological Conditions. *Front. Pharmacol.* 2021, 11, 627838, doi:10.3389/fphar.2020.627838

10. Booz G.W. Cannabidiol as an emergent therapeutic strategy for lessening the impact of inflammation on oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2011, 51(5), 1054-61, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.007

11. 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

12. Boswell-Casteel R.C.; Hays F.A. Equilibrative nucleoside transporters - a review. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2017, 36, 7–30, doi:10.1080/15257770.2016.1210805

13. Burnstock, G. Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. *Circ Res.* 2017, 120(1), 207-228, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309726

14. Burnstock, G.; Pelleg, A. Cardiac purinergic signalling in health and disease. *Purinergic Signal.* 2015, 11, 1–46, doi:10.1007/s11302-014-9436-1

15. Carrier, E.J.; Auchampach, J.A.; Hillard, C.J. Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006, 103, 7895–7900, doi:10.1073/pnas.0511232103

16. CBD, 2021. https://cdn.shopify.com/s/files/1/0085/2846/1905/files/Certificate_-_Vitality_CBD_Dual_applicator_4800mg_Natural_-_WO022343.pdf

17. Choi, J.S.; Berdis, A.J. Nucleoside transporters: biological insights and therapeutic applications. *Future Med. Chem.* 2012, 4, 1461–1478, doi:10.4155/fmc.12.79

18. Deiana, S.; Watanabe, A.; Yamasaki, Y.; Amada, N.; Arthur, M.; Fleming, S.; Woodcock, H.; Dorward, P.; Pigliacampo, B.; Close, S.; Platt, B.; Riedel, G. Plasma and brain pharmacokinetic profile of cannabidiol (CBD), cannabidivarin (CBDV), Δ^9 -tetrahydrocannabivarin (THCV) and cannabigerol (CBG) in rats and mice following oral and intraperitoneal administration and CBD action on obsessive-compulsive behaviour. *Psychopharmacology (Berl).* 2012, 219, 859-873, doi:10.1007/s00213-011-2415-0

19. Dekanski, D.; Piperski, V.; Tasić, J.; Marković, I.D.; Jokanović, 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

20. 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

21. 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
22. Drugbank-1. <https://go.drugbank.com/drugs/DB09061>
23. Drugbank-2. <https://go.drugbank.com/drugs/DB09061#BE0000013>
24. Dziwenka, M.; Coppock, R.; Alexander, M.; Palumbo, E.; Ramirez, C.; Lermer, S. Safety Assessment of a Hemp Extract using Genotoxicity and Oral Repeat-Dose Toxicity Studies in Sprague-Dawley Rats. *Toxicol. Rep.* 2020, 7, 376-385, doi:10.1016/j.toxrep.2020.02.014
25. El-Remessy, A.B.; Al-Shabrawey, M.; Khalifa, Y.; Tsai, N.T.; Caldwell, R.B.; Liou, G.I. Neuroprotective and blood-retinal barrier-preserving effects of cannabidiol in experimental diabetes. *Am. J. Pathol.* 2006, 168, 235-244, doi:10.2353/ajpath.2006.050500
26. 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
27. 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, WOS: 000172904700003
28. 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.* 2011, 63, 1–34, doi:10.1124/pr.110.003285
29. García-Gutiérrez, M.S.; Navarrete, F.; Gasparyan, A.; Austrich-Olivares, A.; Sala, F.; Manzanares, J. Cannabidiol: A Potential New Alternative for the Treatment of Anxiety, Depression, and Psychotic Disorders. *Biomolecules.* 2020, 10(11), 1575, doi: 10.3390/biom10111575
30. Gesztelyi, R.; Kiss, Z.; Wachal, Z.; Juhasz, B.; Bombicz, M.; Csepányi, 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 A₁ adenosine receptor antagonist, on the negative inotropic action of A₁ adenosine receptor full agonists in isolated guinea pig left atria. *Arch. Pharm. Res.* 2013, 36, 293–305, doi:10.1007/s12272-013-0056-z
31. 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

32. 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
33. Gonca, E.; Darici, F. The effect of cannabidiol on ischemia/reperfusion-induced ventricular arrhythmias: the role of adenosine A1 receptors. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 2015, 20, 76–83, doi:10.1177/1074248414532013
34. GraphPad Software Inc. <https://www.graphpad.com/guides/prism/8/curve-fitting/index.htm>
35. Grenzner, 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
36. Grenzner, 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
37. Grubb, A.F.; Greene, S.J.; Fudim, M.; Dewald, T.; Mentz, R.J. Drugs of Abuse and Heart Failure. *J. Card. Fail.* 2021, 27, 1260–1275, doi:10.1016/j.cardfail.2021.05.023
38. Guieu, R.; Brignole, M.; Deharo, J.C.; Deharo, P.; Mottola, G.; Gropelli, A.; Paganelli, F.; Ruf, J. Adenosine Receptor Reserve and Long-Term Potentiation: Unconventional Adaptive Mechanisms in Cardiovascular Diseases? *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 7584, doi:10.3390/ijms22147584
39. Headrick, J.P. Interstitial adenosine and function in rat heart in vivo: effects of adrenaline and 8-cyclopentyl-1,3-dimethylxanthine. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1996, 23, 386–394, doi:10.1111/j.1440-1681.1996.tb02746.x
40. 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
41. Henning, R.J. Type-2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Future Cardiol.* 2018, 14, 491–509, doi:10.2217/fca-2018-0045
42. Hložek, T.; Uttl, L.; Kadeřábek, L.; Balíková, M.; Lhotková, E.; Horsley, R.R.; Nováková, P.; Šichová, K.; Štefková, K.; Tylš, F.; Kuchař, M.; Páleníček, T. Pharmacokinetic and behavioural profile of THC, CBD, and THC+CBD combination after pulmonary, oral, and subcutaneous administration in rats and confirmation of conversion in vivo of CBD to THC. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2017, 27(12), 1223–1237, doi: 10.1016/j.euroneuro.2017.10.037

43. Horváth, B.; Mukhopadhyay, P.; Haskó, G.; Pacher, P.: The endocannabinoid system and plant-derived cannabinoids in diabetes and diabetic complications. *Am J Pathol.* 2012, 180(2), 432-42, doi: 10.1016/j.ajpath.2011.11.003
44. Ibeas Bih, C.; Chen, T.; Nunn, A.V.; Bazelot, M.; Dallas, M.; Whalley B.J. Molecular Targets of Cannabidiol in Neurological Disorders. *Neurotherapeutics.* 2015, 12, 699–730, doi:10.1007/s13311-015-0377-3
45. IJzerman A.P.; Jacobson K.A.; Müller C.E.; Cronstein B.N.; Cunha R.A. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CXII: Adenosine Receptors: A Further Update. *Pharmacol Rev.* 2022, 74(2), 340-372, doi: 10.1124/pharmrev.121.000445
46. Juhasz, B.; Der, P.; Turoczi, T.; Bacsokay, I.; Varga, E.; Tosaki, A. Preconditioning in intact and previously diseased myocardium: laboratory or clinical dilemma? *Antioxid. Redox Signal.* 2004, 6, 325–333, doi:10.1089/152308604322899396
47. Karimian Azari E.; Kerrigan A.; O'Connor A. Naturally Occurring Cannabinoids and their Role in Modulation of Cardiovascular Health. *J. Diet. Suppl.* 2020, 17, 625-650, doi:10.1080/19390211.2020.1790708
48. 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
49. Karsai, D.; Zsuga, J.; Juhasz, B.; Der, P.; Szentmiklosi, A.J.; Tosaki, 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
50. Kicman, A.; Toczek, M. The Effects of Cannabidiol, a Non-Intoxicating Compound of Cannabis, on the Cardiovascular System in Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 6740, doi:10.3390/ijms21186740
51. 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
52. Lasley RD, Mentzer RM Jr. Dose-dependent effects of adenosine on interstitial fluid adenosine and postischemic function in the isolated rat heart. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998, 286(2), 806-11, PMID: 9694937
53. Lasley, R.D. Adenosine Receptor-Mediated Cardioprotection-Current Limitations and Future Directions. *Front. Pharmacol.* 2018, 9, 310, doi:10.3389/fphar.2018.00310

54. Liou, G.I.; Auchampach, J.A.; Hillard, C.J.; Zhu, G.; Yousufzai, B.; Mian, S.; Khan, S.; Khalifa, Y. Mediation of cannabidiol anti-inflammation in the retina by equilibrative nucleoside transporter and A2A adenosine receptor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008, 49, 5526–5531, doi:10.1167/iovs.08-2196
55. 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
56. Millar, S.A.; Maguire, R.F.; Yates, A.S.; O'Sullivan, S.E. Towards Better Delivery of Cannabidiol (CBD). *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020, 13, 219, doi:10.3390/ph13090219
57. Millar, S.A.; Stone, N.L.; Bellman, Z.D.; Yates, A.S.; England, T.J.; O'Sullivan, S.E. A systematic review of cannabidiol dosing in clinical populations. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2019, 85, 1888-1900, doi:10.1111/bcp.14038
58. Monaghan, N. *Law of Evidence*; p. 6, Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2015, ISBN:9781107020337
59. Morales, P.; Hurst, D.P.; Reggio, P.H. Molecular Targets of the Phytocannabinoids: A Complex Picture. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 2017, 103, 103-131, doi:10.1007/978-3-319-45541-9_4
60. 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
61. Müller, C.E.; Iqbal, J.; Baqi, Y.; Zimmermann, H.; Röllich, A.; Stephan H. Polyoxometalates – a new class of potent ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, 16, 5943–5947, doi:10.1016/j.bmcl.2006.09.003
62. Mundell, S.; Kelly, E. Adenosine receptor desensitization and trafficking. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011, 1808, 1319–1328, doi:10.1016/j.bbamem.2010.06.007
63. Nair, A.B.; Jacob, S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J. Basic Clin. Pharm.* 2016, 7, 27-31, doi:10.4103/0976-0105.177703
64. Ohtsuki, T.; Friesen, J.B.; Chen, S.N.; McAlpine, J.B.; Pauli, G.F. Selective Preparation and High Dynamic-Range Analysis of Cannabinoids in "CBD Oil" and Other Cannabis sativa Preparations. *J. Nat. Prod.* 2022, 85, 634-646, doi:10.1021/acs.jnatprod.1c00976
65. Ożarowski, M.; Karpiński, T.M.; Zielińska, A.; Souto, E.B.; Wielgus, K. Cannabidiol in

Neurological and Neoplastic Diseases: Latest Developments on the Molecular Mechanism of Action. *Int J Mol Sci.* 2021, 22(9), 4294, doi: 10.3390/ijms22094294

66. 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

67. 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

68. Pandolfo, P.; Silveirinha, V.; dos Santos-Rodrigues, A.; Venance, L.; Ledent, C.; Takahashi, R.N.; Cunha, R.A.; Köfalvi, A. Cannabinoids inhibit the synaptic uptake of adenosine and dopamine in the rat and mouse striatum. *Eur. J. Pharmacol.* 2011, 655, 38–45, doi:10.1016/j.ejphar.2011.01.013

69. Pannico, A.; Kyriacou, M.C.; El-Nakhel, C.; Graziani, G.; Carillo, P.; Corrado, G.; Ritieni, A.; Roupheal, Y.; De Pascale, S. Hemp microgreens as an innovative functional food: Variation in the organic acids, amino acids, polyphenols, and cannabinoids composition of six hemp cultivars. *Food Res. Int.* 2022, 161, 111863, doi:10.1016/j.foodres.2022.111863

70. 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

71. Pellati, F.; Brighenti, V.; Sperlea, J.; Marchetti, L.; Bertelli, D.; Benvenuti, S. New Methods for the Comprehensive Analysis of Bioactive Compounds in *Cannabis sativa* L. (hemp). *Molecules.* 2018, 23, 2639, doi:10.3390/molecules23102639

72. Peng, J.; Fan, M.; An, C.; Ni, F.; Huang, W.; Luo, J. A narrative review of molecular mechanism and therapeutic effect of cannabidiol (CBD). *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2022, 130, 439–456, doi:10.1111/bcpt.13710

73. Pimenta-Dos-Reis, G.; Torres, E.J.L.; Quintana, P.G.; Vidal, L.O.; Dos Santos, B.A.F.; Lin, C.S.; Heise, N.; Persechini, P.M.; Schachter, J. POM-1 inhibits P2 receptors and exhibits anti-inflammatory effects in macrophages. *Purinergic Signal.* 2017, 13, 611–627, doi:10.1007/s11302-017-9588-x

74. Procopio, M.C.; Lauro, R.; Nasso, C.; Carerj, S.; Squadrito, F.; Bitto, A.; Di Bella, G.; Micari, A.; Irrera, N.; Costa, F. Role of Adenosine and Purinergic Receptors in Myocardial Infarction: Focus on Different Signal Transduction Pathways. *Biomedicines* 2021, 9, 204, doi:10.3390/biomedicines9020204

75. Rajesh, M.; Mukhopadhyay, P.; Bátkai, S., Patel, V., Saito, K., Matsumoto, S., Kashiwaya, Y., Horváth, B., Mukhopadhyay, B., Becker, L., Haskó, G., Liaudet, L., Wink, D.A., Veves, A., Mechoulam, R., Pacher, P. Cannabidiol attenuates cardiac dysfunction, oxidative stress, fibrosis, and inflammatory and cell death signaling pathways in diabetic cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010, 56(25), 2115-25, doi:10.1016/j.jacc.2010.07.033
76. Ren, G.; Zhang, X.; Li, Y.; Ridout, K.; Serrano-Serrano, M.L.; Yang, Y.; Liu, A.; Ravikanth, G.; Nawaz, M.A.; Mumtaz, A.S.; Salamin, N.; Fumagalli, L. Large-scale whole-genome resequencing unravels the domestication history of *Cannabis sativa*. *Science Advances.* 2021, 7, 29, doi:10.1126/sciadv.abg2286
77. Santiago, A.N.; Mori, M.A.; Guimarães, F.S.; Milani, H.; Weffort de Oliveira, R.M. Effects of Cannabidiol on Diabetes Outcomes and Chronic Cerebral Hypoperfusion Comorbidities in Middle-Aged Rats. *Neurotox. Res.* 2019, 35, 463-474, doi:10.1007/s12640-018-9972-5
78. 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
79. Scandiffio, R.; Geddo, F.; Cottone, E.; Querio, G.; Antoniotti, S.; Gallo, M.P.; Maffei, M.E.; Bovolin, P. Protective Effects of (E)- β -Caryophyllene (BCP) in Chronic Inflammation. *Nutrients.* 2020, 12, 3273, doi:10.3390/nu12113273
80. Schädlich IS, Winzer R, Stabernack J, Tolosa E, Magnus T, Rissiek B. The role of the ATP-adenosine axis in ischemic stroke. *Semin Immunopathol.* 2023, 45(3), 347-365, doi:10.1007/s00281-023-00987-3
81. Schmies, C.C.; Rolshoven, G.; Idris, R.M.; Losenkova, K.; Renn, C.; Schäkel, L.; Al-Hroub, H.; Wang, Y.; Garofano, F.; Schmidt-Wolf, I.G.H.; Zimmermann, H.; Yegutkin, G.G.; Müller, C.E. Fluorescent Probes for Ecto-5'-nucleotidase (CD73). *ACS Med. Chem. Lett.* 2020, 11, 2253–2260, doi:10.1021/acsmchemlett.0c00391
82. 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
83. Sunda, F.; Arowolo, A. A molecular basis for the anti-inflammatory and anti-fibrosis properties of cannabidiol. *FASEB J.* 2020, 34, 14083–14092, doi:10.1096/fj.202000975R
84. Szabo, A.M.; Erdei, T.; Viczjan, G.; Kiss, R.; Zsuga, J.; Papp, C.; Pinter, A.; Juhasz, B.; Szilvassy, Z.; Gesztelyi, R. An Advanced In Silico Modelling of the Interaction between FSCPX, an Irreversible A1 Adenosine Receptor Antagonist, and NBTI, a Nucleoside Transport Inhibitor, in the Guinea Pig Atrium. *Molecules* 2019a, 24, 2207,

doi:10.3390/molecules24122207

85. Szabo, A.M.; Viczjan, G.; Erdei, T.; Simon, I.; Kiss, R.; Szentmiklosi, A.J.; Juhasz, B.; Papp, C.; Zsuga, J.; Pinter, A.; Szilvassy, Z.; Gesztelyi, R. Accuracy and Precision of the Receptorial Responsiveness Method (RRM) in the Quantification of A1 Adenosine Receptor Agonists. *Int. J. Mol. Sci.* 2019b, 20, 6264, doi:10.3390/ijms20246264
86. 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
87. Thorn, J.A.; Jarvis, S.M. Adenosine transporters. *Gen. Pharmacol.* 1996, 27, 613-620, doi:10.1016/0306-3623(95)02053-5
88. Tiwari-Heckler, S.; Jiang, Z.G. Adenosinergic Signaling in Liver Fibrosis. *Clin Liver Dis (Hoboken)*. 2019, 14(1), 1-4, doi: 10.1002/cld.777
89. 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, 815-8, doi:10.1016/s0960-894x(01)00069-5
90. van Rossum, J.M. General Introduction. In *Kinetics of Drug Action*, 1st ed.; van Rossum, J.M., Ed.; Springer-Verlag: Heidelberg, Germany, 1977, doi:10.1007/978-3-642-66537-0
91. Velasco, G; Sánchez, C; Guzmán, M. Anticancer mechanisms of cannabinoids. *Curr Oncol.* 2016, 23(2), S23-32, doi: 10.3747/co.23.3080
92. von der Leyen, H.; Schmitz, W.; Scholz, H.; Scholz, J.; Lohse, M.J.; Schwabe U. Effects of 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine (DPCPX), a highly selective adenosine receptor antagonist, on force of contraction in guinea-pig atrial and ventricular cardiac preparations. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1989, 340, 204–9, doi:10.1007/BF00168970
93. Weiss, L.; Zeira, M.; Reich, S.; Har-Noy, M.; Mechoulam, R.; Slavin, S.; Gallily, R. Cannabidiol lowers incidence of diabetes in non-obese diabetic mice. *Autoimmunity.* 2006, 39, 143-151, doi:10.1080/08916930500356674
94. Weiss, L.; Zeira, M.; Reich, S.; Slavin, S.; Raz, I.; Mechoulam, R.; Gallily, R. Cannabidiol arrests onset of autoimmune diabetes in NOD mice. *Neuropharmacology.* 2008, 54, 244-249, doi:10.1016/j.neuropharm.2007.06.029
95. Wernly, B.; Zhou 周稚超, Z. More purinergic receptors deserve attention as therapeutic targets for the treatment of cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2020, 319(4), H723-H729, doi: 10.1152/ajpheart.00417.2020

96. Weston, J.; Upchurch, W.J.; Iaizzo, P.A. In vitro contractile studies within isolated tissue baths: Translational research from Visible Heart® Laboratories. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 2022, 247, 584–597, doi:10.1177/15353702211070535
97. Wheal, A.J.; Jadoon, K.; Randall, M.D.; O'Sullivan, S.E. In Vivo Cannabidiol Treatment Improves Endothelium-Dependent Vasorelaxation in Mesenteric Arteries of Zucker Diabetic Fatty Rats. *Front. Pharmacol.* 2017, 8, 248, doi:10.3389/fphar.2017.00248
98. WHO, 2019. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
99. WHO, 2023. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
100. Willems, L.; Reichelt, M.E.; Molina, J.G.; Sun, C.X.; Chunn, J.L.; Ashton, K.J.; Schnermann, J.; Blackburn, M.R.; Headrick, J.P. Effects of adenosine deaminase and A1 receptor deficiency in normoxic and ischaemic mouse hearts. *Cardiovasc Res.* 2006, 71, 79–87, doi:10.1016/j.cardiores.2006.03.006
101. Williams, T.M.; Bengtson, P.; Steller, D.L.; Croll, D.A.; Davis, R.W. The Healthy Heart: Lessons from Nature's Elite Athletes. *Physiology* (Bethesda) 2015, 30, 349–357, doi:10.1152/physiol.00017.2015
102. Zhou, R; Dang, X; Sprague, R.S.; Mustafa, S.J.; Zhou, Z. Alteration of purinergic signaling in diabetes: Focus on vascular function. *J Mol Cell Cardiol.* 2020, 140, 1-9, doi: 10.1016/j.yjmcc.2020.02.004
103. Zimmermann, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2000, 362, 299-309, doi:10.1007/s002100000309
104. 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, 839, doi:10.3390/molecules22050839



Nyilvántartási szám: DEENK/353/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Viczján Gábor

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

További közlemények

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





5. 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), 1-14, 2019.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20246264>

IF: 4.556

6. 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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 19,631

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
11,808**

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, 2023.07.19.



9. Tárgyszavak

Magyar tárgyszavak: adenzin, A₁ adenzin receptor, CBD, CD39, CD73, CPA, diabétesz mellitusz, ENT1, FSCPX, inotrópia, NBTI, operatív modell, receptoriális válaszkészség módszer, patkány, pitvar, POM-1, PSB-12379, RRM, tengerimalac, ZDF

Angol tárgyszavak: adenosine, A₁ adenosine receptor, CBD, CD39, CD73, CPA, diabetes mellitus, ENT1, FSCPX, inotropy, NBTI, operational model, receptorial responsiveness method, rat, atrium, POM-1, PSB-12379, RRM, guinea pig, ZDF

10. Köszönetnyilvánítás

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

Köszönetet mondok témavezetőmnek, Dr. Gesztelyi Rudolf egyetemi docensnek (DE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet), aki mindig nagyon segítőkész volt, útmutatása és kedvessége nagyon sokat számított PhD időszakom alatt.

Köszönöm munkacsoportunk többi tagjának is a segítségét: Dr. Erdei Tamás, Dr. Lampé Nóra tudományos segédmunkatársaknak, Szabó Katalin és Dr. Óvári Ignác PhD hallgatóknak, valamint Juhász Ildikó és Dávid Anna Mária asszisztenseknek (DE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet).

Köszönöm intézetünk többi dolgozójának is a segítségét, különösen Dr. Juhász Béla egyetemi tanárnak, Dr. Varga Balázs adjunktusnak, továbbá Dr. Szilágyi Anna és Dr. Takács Barbara PhD hallgatóknak.

Köszönöm barátnőmnek, Karácson Reginának segítőkészségét és türelmét. Köszönöm a családomnak is, szüleimnek és testvéremnek is, akik végig támogattak.

PhD munkám anyagi feltételeit az alábbi pályázatok biztosították: EFOP-3.6.2-16-2017-00009, GINOP-2.3.4-15-2016-00002, GINOP-2.3.4-15-2020-00008, TKP2020-NKA-04 (a 2020-4.1.1-TKP2020 pályázati program finanszírozásában).

11. Függelék

Erdei és mtsai 2018-as vizsgálatának kísérleti protokollja és csoportjai

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