

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**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.

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az egészségtudományok tudományágban

Írta: Viczján Gábor okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori Iskola
(Táplálkozástudomány programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Gesztelyi Rudolf, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Pósa Anikó, PhD

Dr. Röszer Tamás, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Bácskay Ildikó, PhD

tagok: Dr. Pósa Anikó, PhD

Dr. Röszer Tamás, PhD

Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna, akadémikus

Dr. Lekli István, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2023. október 30., 13 óra

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

Max Planck

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzések.....	1
1.1. A purinerg transzmisszió	1
1.2. Adenozin, adenozin analógok, receptorok.....	2
1.3. A kannabidiol és az adenozinerg rendszer kapcsolata.....	4
2. Anyagok és módszerek.....	8
2.1. Az FSCPX vizsgálatával kapcsolatos módszerek.....	8
2.1.1. <i>In vitro CD39 és CD73 Inhibitor Screening Assay Kit</i> mérések	8
2.1.1.1. Vegyszerek és oldatok.....	8
2.1.1.2. Protokoll	8
2.1.2. <i>Ex vivo funkcionális vizsgálatok</i>	9
2.1.2.1. Vegyszerek és oldatok.....	9
2.1.2.2. Állatok és csoportok.....	9
2.1.2.3. Protokollok	10
2.1.2.4. Az E/c görbék kiértékelése	12
2.2. CBD-vel kapcsolatos módszerek	13
2.2.1. <i>Vegyszerek és oldatok</i>	13
2.2.2. <i>Állatmodellek és kísérleti csoportok</i>	13
2.2.3. <i>Ex vivo funkcionális vizsgálatok és a protokollok</i>	14
2.2.4. <i>Az E/c görbék korrekciója</i>	14
2.2.5. <i>E/c görbék empirikus jellemzése</i>	15
2.2.6. <i>Az átlagolt CPA E/c görbék CBD okozta torzulásának kvantifikálása</i>	15
2.2.7. <i>Az átlagolt CPA és adenozin E/c görbék CBD által torzított hatás értékeinek korrekciója</i>	16
2.3. Adatelemzés	16
3. Eredmények	17
3.1. FSCPX-szel kapcsolatos eredmények	17
3.2. A CBD-vel kapcsolatos eredmények.....	20
4. Megbeszélés	23
4.1. Az FSCPX-re vonatkozó következtetéseink.....	23
4.2. A CBD-re vonatkozó következtetéseink.....	27
5. Összefoglalás	31
6. Köszönetnyilvánítás.....	32

1. Bevezetés és célkitűzések

1.1. A purinerg transzmisszió

A purinerg receptorokat, melyek kezdetben egy családot alkottak, jelenleg kétfelé oszthatjuk, P1 (P1R) és P2 (P2R) csoportra. A P1 avagy adenosin receptorok családján belül 4 (al)típust különböztetünk meg: A_1R , $A_{2A}R$, $A_{2B}R$, A_3R . A P2 receptorok 2 családra oszthatók: az ionotróp P2X és a metabotróp P2Y. 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 kardiovaszkuláris betegségekben, köztük atherosclerosisban, ischaemiás szívbetegségben, hypertensióban, pulmonális hypertensióban és diabéteszben, ami hozzájárul a kardiovaszkuláris diszfunkció, vaszkuláris remodelling, kóros érpermeabilitás és gyulladás patomechanizmusához.

Az adenosin receptorok mindegyike, továbbá sok P2 receptor is ubikviter expressziójúak a kardiovaszkuláris rendszerben és fontos szabályozó funkciójuk van. Mind a négy adenosin receptor expresszálódik a kardiomiocitákban, az endotéliumban és a vaszkuláris simaizomsejtekben is.

Az A_1R és az A_3R 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 A_1R negatív tróp hatásokat közvetít a szívben, ezzel a β -adrenerg hatások ellen dolgozva. Az $A_{2A}R$ aktiváció indirekte fokozza a szívizom kontraktilitását az A_1R -mediált antiadrenerg hatások gátlása révén, míg az $A_{2B}R$ direkt pozitív inotróp hatást közvetít anélkül, hogy hatna a β -adrenerg vagy A_1R -mediálta antiadrenerg folyamatokra. Az A_3R stimulálása erősít egyes A_1R -mediálta kardioprotektív hatásokat, de kardiomiocita apoptózist is indukálhat.

1.2. Adenozin, adenozin analógok, receptorok

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

Az adenozin receptorok 7 transzmembrán doménnel rendelkező, G-fehérje kapcsolt receptorok: A₁, A_{2A}, A_{2B} és A₃ adenozin receptor. A CPA (*N*⁶-cyclopentyladenosine) és a CHA (*N*⁶-cyclohexyladenosine) szintetikus adenozin analógok, amelyek szelektív, biológiailag stabil (enzimrezisztens, különösen a CHA) és nagy hatékonyságú (különösen a CPA) teljes agonistái az A₁ adenozin receptornak (továbbiakban: A₁ receptor).

Az A₁ receptor stimulálása testszerte protektív és regeneratív folyamatokat indít el. A szívizom domináns adenozin receptor-típusa, amely számos energiaigény-csökkentő folyamatot indít el, beleértve a negatív tróp hatásokat, elsősorban a szupraventrikuláris szívizmon. A szupraventrikuláris szívizomban az adenozin képes a kontrakciós erőt a nyugalmi szint alá is csökkenteni (direkt negatív inotróp hatás). 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.

Az ENT1 a szív egyik fő ekvibratív adenozin transzportere, befolyásolja a különböző nukleozidok és exogén nukleozid analógok eloszlását és szintjét. Az adenozin gyorsan metabolizálódó szubsztrát, amelynek nettó képződése az interstitiumban, nettó eliminációja pedig a sejteken belül történik. A passzív adenozin transzport tehát a sejtekbe irányul (például az endotéliumba és a szívizomsejtekbe), így az ENT1 gátlása növeli az interstitialis adenozin koncentrációját. Az ENT1-en keresztüli adenozin-transzport jelentősége az interstitialis adenozin szint szabályozásában (és ezáltal az adenozin által kiváltott védőfolyamatokban) - hosszú távú ischaemia során - az ENT1 csökkent expressziójában és aktivitásában tükröződik. Az ennek következtében megemelkedett interstitialis adenozin koncentráció fokozza az adenozinerg jelátvitelt az adenozin receptorok ortoszterikus kötőhelyének sejtfelszíni lokalizációja miatt.

A nitrobenziltioinozin származékok (pl. NBMPR és NBTI) az ENT1 szelektív inhibitorai. A nitrobenziltioinozinok jelentős mértékben módosítják az ENT1 által szállított molekulák szöveti eloszlását, ily módon drasztikusan átformálják az adenzin receptor agonisták koncentráció-hatás (E/c) görbáját két mechanizmus révén, amelyeket általános, illetve specifikus hatásoknak nevezhetünk.

A nitrobenziltioinozinok általános módosító hatása az összes adenzin receptor agonista E/c görbáját érinti, mivel ezt az endogén adenzin interstitialis szintjének változása közvetíti, ami a transzmembrán adenzin áramlás blokkolása miatt következik be. A szívben az ENT1 gátlása általában megnöveli az endogén adenzin interstitialis koncentrációját, mivel fiziológias körülmények között az adenzin áramlás a sejt belsejébe irányul. Ez az általános hatás az E_{max} csökkenésében és az EC_{50} növekedésében nyilvánul meg

Az FSCPX szelektív, irreverzibilis A_1 receptor antagonistaként ismert. Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai során azonban megfigyelte, hogy az FSCPX-szel történő előkezelés paradox módon növelte az adenzinra és a CPA-ra adott direkt negatív inotróp választ, de csak akkor, ha NBTI is jelen volt a rendszerben. 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 adenzin termelés gátlása.

A jelen disszertációt megalapozó vizsgálatainkig ez a hipotézis egyetlen kísérleti modellből (izolált és ingerelt tengerimalac bal pitvar) kapott *ex vivo* adatokon alapult adenzin, CPA, FSCPX és NBTI alkalmazásával. Ezen adatok értelmezéséhez korábban egy egyszerű matematikai modellt dolgoztunk ki, majd alkalmaztunk. Az FSCPX paradoxon magyarázatára azt a hipotézist fogalmazzuk meg, hogy az FSCPX gátolhat egy (vagy néhány) enzimet, amelyek részt vesznek az adenzin interstitialis képzésében. 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).

Az endogén és exogén adenzin megkülönböztetését az indokolja, hogy az E/c görbék hagyományos módon történő kiértékelésekor az endogén adenzin interstitialis szintjének növekedése ellentétes hatást gyakorol egy adenzin receptor agonista E/c

görbéjére, mint az exogén adenzin interstitialis szintjének növekedése a saját E/c görbéjére. A nitrobenziltioinozinok azáltal, hogy gátolják az adenzin intracelluláris eliminációját, megemelik az adenzin interstitialis szintjét, függetlenül annak eredetétől. 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, ezért koncentrációjukat a nitrobenziltioinozinok csak kismértékben befolyásolják (kísérleteink időablakában). Ennélfogva a biológiailag stabil szintetikus agonisták alkalmasak a nitrobenziltioinozinok általános E/c görbe módosító hatásának izolált vizsgálatára, 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.

Jelen vizsgálatban az volt a célunk, hogy teszteljük az FSCPX egy (vagy néhány) adenzin képző enzimre gyakorolt gátló hatásáról szóló hipotézisünket az interstitiumban. Kézenfekvő stratégia volt, hogy először az ektonukleotidázok lehetséges szerepét vizsgáljuk az FSCPX-paradoxonban. Az ektonukleotidázok kulcsszerepet játszanak az adenzin extracelluláris képződésében. 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). 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.

1.3. 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 -tetrahidrokannabinoltól (THC), a legismertebb (és leghírhedtebb) fitokannabinoidtól. A CBD-t sokan nem tartják pszichoaktívnak, míg mások szerint a CBD-t anxiolitikus, antipszichotikus és antidepresszáns tulajdonsága pszichoaktívvá teszi, ugyanakkor mégsem kábítószer (nem váltja ki a kannabinoid kábítószerekre

jellemző toxikus tünetegyüttest, az ún. kannabinoid tetrádot, továbbá addikciót sem okoz). A CBD fő forrása a kender, amely egy gyűjtőnév, a Cannabis sativa három fő fajtájának egyikére utal.

2018-ban a CBD-t elfogadták a gyermekkori epilepsziák két típusának, a Dravet és a Lennoux-Gastaut szindrómának a kezelésére. A CBD jól bizonyított, illetve feltételezett molekuláris célpontjainak listája az emberi szervezetben több mint ötven enzimet, ioncsatornát, receptort és transzportert felölel, melynek révén a CBD gyulladáscsökkentő, rákellenes, neuroprotektív, görcsoldó, anxiolitikus, antipszichotikus, antidepresszív, antidiabetikus és elhízás elleni hatást fejt ki.

Daganatellenes hatását számos *in vitro* és *in vivo* tanulmány bizonyította (ráktípustól és dózistól függően). A CB₁ és CB₂ receptortól 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.

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, melynek aktivációja gyulladáscsökkentő hatású és csökkenti az A β depozitumok mennyiségét.

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

Hím Wistar patkányokban a CBD csökkentette a stressz hatását a viselkedésre és a kardiovaszkuláris rendszer működésére, melynek hátterében a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese (HPA) tengely gátlása és az 5-HT_{1A} 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. Ezen eredmények igazolják az endokannabinoid rendszer részvételét a CBD antidepresszáns-szerű hatásainak létrehozásában.

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 szubkután zsírszövetben is, melyek ígéretes célpontok lehetnek gyulladáscsökkentőként és az elhízás ellen.

A CBD késleltette a diabétesz mellitusz (DM) kialakulását NOD (non-obese diabetes-prone) egerekben. Ennek magyarázata az lehet, hogy megváltoztatta a T limfociták 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. 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.

A CBD az adenzinerg rendszerre is hatással van. A kutatások szerint a szívizom funkciója szempontjából a CBD két legfontosabb célpontja az A₁ adenzin receptor (a szívben) és az ENT1 (neuronokban, makrofágokban, retina- és agyi mikroglia-sejtekben).

Az eddigi kísérletes adatokból kiindulva tehát a CBD két támadásponton is beavatkozhat a szívizom adenzinerg jelátvitelére: az ENT1 transzporterrel, melyet kielégítően igazoltak, és az A₁ adenzin receptoron, ami eddig feltételezés volt. Vizsgálatainkig ezen útvonalak hozzájárulásának mértéke a CBD hatásához tisztázatlan volt. **A jelen értekezést megalapozó második vizsgálatunk célja tehát az volt, hogy feltárja a fő mechanizmust, amellyel a CBD kifejti hatását a szívizom adenzinerg jelátvitelére.** Azért, hogy különbséget tudjunk tenni az A₁ adenzin receptor agonizmus és az adenzin transzport gátlása révén létrejövő adenzinerg aktivációk között, egy saját fejlesztésű módszert alkalmaztunk, a

receptoriális válaszkészség módszert (RRM). Az RRM lehetővé teszi A_1 receptor agonisták koncentráció-hatás (E/c) görbéinek korrekcióját a többlet adenzin okozta torzításra.

A CBD lehetséges terápiás előnyei alapján, melyek mind 1-es, mind 2-es típusú diabetes mellitusban érintik a szívet is, ezeket a vizsgálatainkat ZDF 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. Egy "beteg" állatmodellnek nagyobb transzlációs 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.

2. Anyagok és módszerek

2.1. Az FSCPX vizsgálatával kapcsolatos módszerek

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

2.1.1.1. 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, a CD39 Inhibitor Screening Assay Kit részeként); dinátrium *N*⁶-benzyl- α,β -methyleadenosine-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).

2.1.1.2. 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, 1% DMSO-t tartalmazó negatív kontroll, 10% DMSO-t tartalmazó negatív kontroll, pozitív kontroll, 1% DMSO-t tartalmazó pozitív kontroll,

10% DMSO-t tartalmazó pozitív kontroll, 20 μM POM-1 tartalmú inhibitor kontroll, 200 μM POM-1 tartalmú inhibitor kontroll, 0.1 μM PSB-12379 tartalmú inhibitor kontroll, 1 μM PSB-12379 tartalmú inhibitor kontroll, 10 μM FSCPX-et tartalmazó reakcióelegy (1% DMSO-ban oldva), 100 μM FSCPX-et tartalmazó reakcióelegy (10% DMSO-ban oldva), 10 μM CPX-et tartalmazó reakcióelegy (1% DMSO-ban oldva), 100 μM CPX-et tartalmazó reakcióelegy (10% DMSO-ban oldva).

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.

2.1.2. *Ex vivo* funkcionális vizsgálatok

2.1.2.1. Vegyszerek és oldatok

A szervkádak feltöltéséhez módosított Krebs-Henseleit puffert (Krebs-oldat) használtunk. 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 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 koncentrációjúra. Az adenzin, CHA és CPA törzsoldatok hígítása Krebs-oldatban történt.

2.1.2.2. 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. A preparátumokat platina elektródokkal pontszerűen ingereltük (3 Hz, 1 ms, a küszöbfeszültség kétszeresével) programozható stimulátor és erősítő segítségével.

A kontrakciós erőt az izometriás összehúzódások amplitúdójával jellemeztük, amit transzducerrel és jelerősítővel mértünk. Mivel a nyugalmi kontraktilitás csökkenését követtük, a direkt negatív inotróp hatást határoztuk meg, ami klasszikus szervkád rendszerben izolált, ingerelt bal pitvari fülcsén mérve egyszerű és rendkívül megbízható módja a myocardialis A₁ adozin receptor funkció vizsgálatának.

Amikor az FSCPX és az NBMPR közötti potenciális interakciót vizsgáltuk, a patkány bal pitvari fülcséket véletlenszerűen 5 csoportba soroltuk: „Kontroll NBMPR-hez”, „NBMPR”, „Kontroll FSCPX & FSCPX+NBMPR-hez”, „FSCPX” és „FSCPX+NBMPR”.

A PSB-12379 és NBTI közötti lehetséges interakció vizsgálatához a tengerimalac bal pitvari fülcséket véletlenszerűen 6 csoportba osztottuk: „Kontroll (CPA-hoz)”, „NBTI CPA-hoz”, „PSB CPA-hoz”, „PSB+NBTI (CPA-hoz)”, „Kontroll+NBTI+PSB (Ado-hoz)” és „Kontroll+PSB+NBTI (Ado-hoz)”.

Az FSCPX különféle beadási gyakoriságainak vizsgálata során a patkány, ill. tengerimalac bal pitvari fülcséket véletlenszerűen 4 csoportba soroltuk: „DMSO (5 ciklus)”, „FSCPX (1 ciklus)”, „FSCPX (2 ciklus)” és „FSCPX (5 ciklus)”.

2.1.2.3. Protokollok

A Krebs-oldattal feltöltött, karbogénnel szellőztetett szervkádakba (a preparátumok rögzítése után 25 perccel) 100 µM adozint adtunk, melyet 2 perc elteltével Krebs-oldattal kimostunk a rendszerből (adenozin „edzés”). 20 perc mosás után kumulatív E/c görbét vettünk fel adozinnal, 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 vizsgálatokor az 5 csoportba sorolt patkány bal pitvarokon öt, egy korábbi vizsgálatunk során már alkalmazott protokollt követtünk, melyeken három módosítást végeztünk: CPA helyett CHA-t, míg NBTI helyett NBMPR-t használtunk, valamint néhány korábban alkalmazott protokollt kihagytunk (amikor az adenozin használtuk fő agonistaként).

Minden pitvart a következő *in vitro* kezeléseknél vetettük alá: „Kontroll NBMPR-hez” esetében 10 µl DMSO-t adtunk 15 percig; az „NBMPR” csoport esetében 10 µM NBMPR-t 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 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 adtunk 45 percig, ezt követően 60 perces mosási periódus után 10 µM NBMPR-t 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 PSB-12379 és NBTI közötti lehetséges interakció vizsgálatokor 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 adenozin és CPA használata; ahol az adenozin a fő agonista, ott a korábbi tanulmányunkban is alkalmazott protokoll használata; valamint FSCPX helyett PSB-12379 használata (az ehhez megfelelő inkubációs és kimosási szakokat alkalmazva). Így a „Kontroll CPA-hoz” csoport pitvaraihoz 10 µM DMSO-t adtunk 15 percig; az „NBTI CPA-hoz” pitvaraihoz 10 µM NBTI-t adtunk 15 percig; a „PSB (CPA-hoz)” pitvaraihoz 10 µl DMSO-t és 3 µM PSB-12379-et adtunk 15 percig; a „PSB+NBTI CPA-hoz” pitvaraihoz 3 µM PSB-12379-et adtunk 15 percig és 10 µM NBTI-t további 15 percig; a „Kontroll+NBTI+PSB (Ado-hoz)” pitvaraihoz 10 µM NBTI-t adtunk; a „Kontroll+PSB+NBTI (Ado-hoz)” pitvaraihoz 10 µl DMSO-t és 3 µM 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 µM PSB-12379-et adtunk 15 percig, utána 10 µM NBTI-t további 15 percig. Végül ezen utolsó 2 csoportban egy harmadik

kumulatív adenzin E/c görbe görbét is felvettünk. Így összességében a „Kontroll+NBTI+PSB Ado-hoz” és a „Kontroll+PSB+NBTI Ado-hoz” pitvarok esetében háromféle adenzin 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 µl DMSO-t adtunk 45 percig, majd 75 perces kimosási fázis következett, míg a többi három csoport esetében 10 µM FSCPX 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 µM FSCPX vagy 10 µl DMSO újbóli bemérése követett. Az „FSCPX (2 ciklus)” csoportban a 45 perces inkubációt 22.5 percnél megszakítottuk egy rövid, de intenzív mosással, majd a 10 µM FSCPX-et 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 µM FSCPX-et vagy a 10 µl DMSO-t. Végezetül minden pitvar esetében kumulatív CPA E/c görbét vettünk fel.

2.1.2.4. Az E/c görbék kiértékelése

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

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

2.2. CBD-vel kapcsolatos módszerek

2.2.1. 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), "Vitality CBD Oral Drops/Spray 4800mg Natural" néven közvetlenül a gyártótól rendelve (Vitality CBD Ltd, Birmingham, Egyesült Királyság) (PhytoVista Laboratories, 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. 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.

2.2.2. 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) (Charles River).

A 6 hónapos obese ZDF patkányokat véletlenszerűen két csoportba soroltuk: „Obese ZDF” és „CBD-kezelt obese ZDF”, míg a lean állatok a „Lean ZDF” csoportot

alkották. 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 napraforgóolaj, illetve CBD kezelés megkezdése előtti napon az éhgyomri vércukor koncentráció (mmol/l-ben kifejezve) (átlag \pm SEM): 5.9 ± 0.1 , 19.1 ± 2.1 és 23.3 ± 1.4 volt, míg az *in vivo* kezelés befejezését követő napon 5.6 ± 0.1 , 19.3 ± 1.7 és 20.5 ± 1.7 a Lean ZDF, Obese ZDF és a CBD-kezelt obese ZDF csoportokban (az említés sorrendjében).

Az *in vivo* kezelések kezdetén az állatok testtömege (grammban kifejezve) (átlag \pm SEM): 388.8 ± 7.6 , 364.5 ± 25.8 és 368.1 ± 14.2 volt, míg az *in vivo* kezelések végére ezek az értékek 413.2 ± 8.2 , 403.5 ± 28.9 és 398.4 ± 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).

2.2.3. *Ex vivo* funkcionális vizsgálatok és a protokollok

A bal pitvari fülcsék preparálása a 2.1.2.2. alfejezetben leírtaknak megfelelően történt. Mivel ebben a vizsgálatban sem történt előkezelés kontraktilitást befolyásoló szerrel, itt is az adozin receptor agonisták által kiváltott direkt negatív inotróp hatást mértük.

2.2.4. *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 válaszkésztség módszer (RRM), ami többféle regressziós beállítással is elvégezhető.

Az RRM alkalmas a többlet agonista koncentráció által torzított E/c görbék korrekciójára is.

Egy RRM-mel korrigált teljes (hatástalan koncentrációval induló és jól szaturált) E/c görbének két informatív szakasza van: a kezdeti és a végső. A kezdeti szakasz a többlet agonista koncentráció által (kizárólag vagy túlnyomórészt) kiváltott hatás értékét mutatja (emiat 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

2.2.5. E/c görbék empirikus jellemzése

Az E/c görbék empirikus jellemzésére a Hill-egyenletet illesztettük, ami a receptorfunkció egyszerű és megbízható modelljeként három empirikus paramétert biztosít az E/c görbék geometriai leírására.

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

Mivel a CBD több extrakardiális szöveten igazoltan gátolta az ENT1-et, feltételeztük, hogy a szívizom befelé irányuló adozin transzportját is gátolva adozin többletet halmoz fel a pitvari interstitiumban és ezáltal torzítja a CBD-kezelt obese ZDF csoport E/c görbéit. Ennek a többlet interstitialis adozinnak 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. Az individuális illesztés során a CBD-kezelt obese ZDF csoport átlagolt CPA E/c görbéjének illesztése során az Obese ZDF csoport átlagolt CPA E/c görbéjének három empirikus paraméterét használtuk, a globális illesztés során pedig a fent említett két csoport átlagolt CPA E/c görbéit egyszerre illesztettük variábilis empirikus paraméterekkel. Minden további regressziós beállításnál az alapértelmezett opciót választottuk.

2.2.7. Az átlagolt CPA és adenzin E/c görbék CBD által torzított hatás értékeinek korrekciója

A CBD-kezelt obese ZDF csoport átlagolt CPA és adenzin E/c görbéinek hatás értékeit az individuális plusz hagyományos illesztéssel kapott c_x segítségével korrigáltuk (hasonlóan a korábbi E/c görbe korrekcióinkhoz. Először az ehhez a c_x -hez tartozó hatás értéket állapítottuk meg a Hill-egyenlet segítségével.

Az E_x és a CBD-kezelt obese ZDF csoport átlagolt CPA és adenzin E/c görbéinek torzított hatás értékeiből számoltuk ki a korrigált hatás értékeket. 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.

2.3. Adatelemzés

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 , EC_{50} és c_x) 10-es alapú logaritmusát vettük, az ajánlásnak megfelelően.

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.

3. Eredmények

3.1. FSCPX-szel kapcsolatos eredmények

CD39 és CD73 inhibitor esszé során kapott eredményeink alapján elmondható, hogy sem az 1%-os, sem a 10%-os (v/v) DMSO nem befolyásolta jelentősen a CD39 és CD73 aktivitását. Az ENTPDase1-3 enzimek gátlószereként és egyes P2 purinerg receptorok antagonistájaként is számon tartott POM-1 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 viszont jelentősen csökkentette a CD73 aktivitását, amely hatás szelektív volt (nem terjedt ki a CD39-re) és 1 μM -nál teljesebben 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.

Az FSCPX és az NBMPR közötti interakciót patkány bal pitvaron vizsgáltuk. Az adenzin (mint nem szelektív, fiziológias adenzin receptor teljes agonista) koncentráció-függően csökkentette a patkány bal pitvari fülcsék nyugalmi kontrakciós erejét az összes vizsgálati csoportban. Az adenzinra 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 adenzinerg mechanizmusok szempontjából. 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. [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.] A CHA-ra adott válaszról a különböző *in vitro* kezelések után elmondható, hogy 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 toltta 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. Ezen patkány pitvaron nyert eredmények megerősítik korábbi, tengerimalac pitvaron kapott hasonló eredményeinket. Bár az FSCPX és a nitrobenziltioinozinok önmagukban kifejtett hatása a szintetikus A₁ 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.

A PSB-12379 és az NBTI kölcsönhatását tengerimalac bal pitvaron vizsgáltuk. A csoportok első adenzin E/c görbéit tekintve (az *in vitro* kezelések előtt) az adenzin koncentrációtól függően csökkentette a tengerimalac bal pitvar nyugalmi kontraktilis erejét. Az adenzinra adott válasz egyik koncentrációnál sem különbözött szignifikánsan a csoportok között, ami bizonyítja a csoportok homogenitását az adenzinerg mechanizmusok tekintetében. Hasonlóképpen, amikor összehasonlítottuk a Kontroll+NBTI+PSB (Ado-hoz) és a Kontroll+PSB+NBTI (Ado-hoz) csoportok harmadik adenzin E/c görbéit, az adenzinra 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. 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. A CPA (szelektív, szintetikus teljes A₁ 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. A PSB-12379 (a CD73 szelektív gátlója, amelynek nincs látható hatása az A₁-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 válasza. Az egyetlen különbség a PSB-12379 és az FSCPX "anti-NBTI" hatása között az, hogy előbbi gyengébb volt, mint utóbbi. A CPA-val kapott eredményekhez hasonlóan, a PSB-12379 önmagában adva nem befolyásolta jelentősen az adenzin hatását. Fontos, hogy a CPA-val kapott eredményekkel összhangban a PSB-12379 szignifikánsan gátolta az NBTI hatását az adenzinra adott válasza, 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. Szintén összhangban a CPA-val kapott eredményekkel, a PSB-12379 ezen hatása gyengébb volt, mint az FSCPX-é. 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, mint az FSCPX-előkezelés, természetesen az A₁ receptor gátlás következményeit nem számítva. Ez a megállapítás közvetett bizonyítékot szolgáltatott az FSCPX gátló hatására a szív interstitialis adenzin termelésére (legalábbis a patkány és tengerimalac bal pitvarban). Kísérleti körülményeinkből kiindulva az FSCPX e további hatása szintén irreverzibilisnek tűnik

A különböző adagolási módok befolyását az FSCPX-előkezelés hatására patkány és tengerimalac bal pitvaron vizsgáltuk. Az adenzin koncentráció-függően csökkentette a bal pitvarok nyugalmi kontrakciós erejét, mely csökkenés nagyobb volt a tengerimalacok, mint a patkányok esetében. Az adenzin hatása semmilyen koncentrációnál nem különbözött szignifikánsan az azonos fajhoz tartozó csoportok között. Mivel a különböző csoportok a kísérletek ezen szakaszaig ugyanolyan előéletűek voltak, ez az adenzinerg mechanizmusok homogenitását jelzi a csoportok között azonos fajon belül. Emellett a (Hartley típusú) tengerimalac pitvar adenzinnal szembeni nagyobb érzékenységet tapasztalhattuk (a direkt negatív inotrópia szempontjából) a (Wistar típusú) patkány pitvarhoz képest. 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. Az FSCPX előkezelés 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. 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). Ami a patkány pitvarokat illeti, az FSCPX beadások számának kettőről ötre növelése már nem fokozta az FSCPX antagonistá hatását. Ezzel szemben a tengerimalac pitvarokban az FSCPX ötszöri beadása (természetesen meg nem haladva a 10 μ M beadáskori koncentrációt a szervkádban) erősebb antagonistá hatást tett lehetővé, mint a kétszeri. Fontos ugyanakkor, hogy még az FSCPX ötszöri beadása sem tudta csökkenteni a CPA maximális hatását egyik fajban sem. Mind a patkány, mind a tengerimalac pitvarok esetében a CPA E/c görbe adatok individuális illesztése a Hill egyenlettel hasonló E_{max} és Hill-koefficiens (n) értékeket eredményezett, míg a $\log EC_{50}$ értékek lényegesen különböztek. Mivel az FSCPX az A_1 receptor igazoltan irreverzibilis antagonistája, ez az eredmény mindkét faj pitvari szívműködésében nagy A_1 receptor rezervet jelez a CPA direkt negatív inotróp hatására nézve. Ebből kiindulva globális illesztést is alkalmaztunk (megosztott E_{max} és n paraméterekkel), hogy jobban szemléltessük a különböző FSCPX adagolási sémák hatását. A patkány pitvarokban az FSCPX hatását csak az FSCPX beadások számának kettőig történő növelésével lehetett fokozni, valószínűleg az FSCPX maximális hatásának elérése miatt. Tengerimalac pitvaron viszont minél több FSCPX beadás (ciklus) volt egy csoport kezelési protokolljában, annál nagyobb volt az adott csoport $\log EC_{50}$ értéke. Ez összhangban vannak a különböző csoportok CPA E/c görbéinek elhelyezkedésével.

3.2. A CBD-vel kapcsolatos eredmények

A CPA-ra és az adenzinra adott válasz tekintetében mind a CPA, mind az adenzin koncentráció-függően csökkentette a pitvari kontrakciós erőt minden csoportban. Míg a CPA (viszonylag stabil, rosszul transzportálódó, szintetikus A_1 receptor agonista) a CBD-vel kezelt obese ZDF csoportban váltotta ki a leggyengébb választ, addig az adenzin (gyorsan metabolizálódó és transzportálódó, fiziológiás adenzin receptor agonista) éppen ebben a csoportban hozta létre a legerősebb hatást.

A Lean ZDF csoportban a pitvarok CPA-ra és adenzinra adott válasza nem sokban különbözött az Obese ZDF csoportban megfigyelhető válaszoktól.

A CBD által termelt interstitialis adenzin többlettel kapcsolatos vizsgálatok során 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. Az individuális és globális illesztés, valamint a hagyományos és robusztus regresszió kombinációi négy c_x értéket (ugyanakkora hatás létrehozására képes CPA koncentrációt) szolgáltattak a CBD által okozott többlet interstitialis adenzin kvantifikálására. 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.

A CPA és az adenzin E/c görbék korrigált hatásait CBD-kezelt patkány pitvaron vizsgáltuk. A korrigált CBD-kezelt CPA E/c görbe körülbelül 25% határról 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-hatékonny” extra adenzin koncentrációt (EC_{25}) produkált az obese típusú ZDF patkány pitvarok interstitiumában. 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. 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. 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. A CBD-kezelt

adenozin 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 válaszát. Mivel a szívizom A₁ 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).

4. Megbeszélés

4.1. 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. Mellékletként megállapítottuk, hogy az E-NTPDáz1-3 enzimek inhibitoraként számon tartott POM-1 vegyület a CD39 (E-NTPDáz1) mellett a CD73 enzimet is hatékonyan gátolta.

Ex vivo eredményeink nagyrészt E/c görbék transzformációinak elemzésén alapulnak, melyekből következtetéseket vonunk le a mögöttes mechanizmusokra vonatkozóan. 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. 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, 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. 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 görbétől, 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. 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 jelenlétében az FSCPX paradox módon növelte az adenzin és a CPA E/c görbék maximális hatás értékét. Ezen paradox jelenség háttérében 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. 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. Felmerült, hogy ennek oka nem a gátlás hiánya, hanem az volt, hogy az FSCPX vizes közegben gyorsan (2-3 perc alatt) elbomlik. 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 vízbeli stabilitása miatt megbízható eredménynek tartunk. 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 maradó FSCPX gyorsan elbomlik. Ily módon az FSCPX hathat azokon struktúrákon, melyek a lipid kompartmentben vagy azok felszínén helyezkednek el, mint például a membránkötött fehérjék. Ismert, hogy az A₁ receptor, a CD39 és a CD73 is mind membránkötött fehérjék. 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 az FSCPX paradoxon patkány állatmodellen vizsgálva is megmutatkozott. A két nitrobenziltioinozin-kezelt E/c görbét valódi kontroll görbéikkel hasonlítottuk össze: a kizárólag NBMPR- és kizárólag NBTI-kezelt E/c görbéket a natív E/c görbéikkel, míg az FSCPX+NBMPR- és FSCPX+NBTI-kezelt E/c görbéket a kizárólag FSCPX-kezelt E/c görbéikkel. Ez az összehasonlítás megmutatta, hogy az FSCPX előkezelés drasztikusan csökkentette az adott nitrobenziltioinozin-származék hatását az adott stabil A₁ receptor agonista E/c görbéjére. Mivel az NBMPR és az NBTI hatása a stabil A₁ receptor agonisták E/c görbéjére kizárólag az általános E/c görbe módosító hatás, melyet az endogén adenzin interstitialis koncentrációjának növelése mediál, továbbra is felvethető, hogy az FSCPX előkezelés csökkenti az interstitialis adenzin 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 adenzin termelődést, de nem antagonizálja az A₁ receptort. Ezúttal a teljes eredeti kísérletünket megismételtük úgy, hogy FSCPX helyett PSB-12379-et használtunk. Azt tapasztaltuk, hogy a PSB-12379 ugyanolyan módon transzformálta a CPA és az adenzin E/c görbéket, mint ahogy az FSCPX előkezelés tette, eltekintve az E/c görbék jobbra tolódásától, melyet az FSCPX A₁ receptor antagonista 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. 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. Elképzelhető, hogy az erősen lipidoldékony FSCPX hatékonyabban képes gátolni a membránkötött CD73 enzimet, mint a vízóldékony PSB-12379. Összefoglalva, az interstitialis adenzin termelés gátlása képes utánozni az FSCPX A₁ receptor antagonizmuson kívüli hatását.

Végül arra törekedtünk, hogy alá tudjuk támasztani az FSCPX kinetikai vonatkozásaival kapcsolatos feltevésünket. Megvizsgáltuk tehát az FSCPX beadásai számának hatását az FSCPX A₁ receptor antagonista 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. 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 membránkötött célpontokat befolyásol, melynek eredményeként képes

csökkenteni az interstitialis adenzin termelődését a myocardiumban. Legjobb tudomásunk szerint jelenleg a mi kísérleti megközelítésünk az egyetlen olyan *ex vivo* rendszer, ami lehetővé tette az FSCPX paradoxon felismerését és vizsgálatát.

4.2. 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 sajátosságát a CBD számottevő tulajdonságai közül. A CBD tartós, orális adagolása szignifikánsan növelte obese típusú ZDF patkányok izolált, ingerelt bal pitvarainak adenzinra adott választát, ami arra utal, hogy CBD alkalmazása mellett a szívben tartósan fokozott adenzinerg védelem van jelen a metabolikus szindrómára jellemző körülmények között is.

A CPA szignifikánsan kisebb választ váltott ki a CBD-kezelt, obese típusú ZDF patkányokból izolált pitvarokban, mint a vivőanyaggal kezelt obese típusú ZDF patkányok pitvaraiban. Ezzel szemben az adenzin szignifikánsan nagyobb választ váltott ki a CBD-kezelt pitvarokban, mint a vivőanyaggal kezeltekben, igaz, ez csak alacsony és közepes koncentrációknál volt megfigyelhető. Munkacsoportunk korábbi tapasztalatai szerint ez a mintázat jellemző arra az állapotra, amikor a szívizom adenzin transzportja gátolva van. Ennek oka, hogy megfelelő oxigénellátás esetén a szívizom adenzin transzportja a sejtekbe irányul, így gátlása növeli az endogén adenzin interstitialis szintjét. Ez a többlet interstitialis adenzin elhasználja az adenzin receptorok válaszadási kapacitásának egy részét még azelőtt, hogy E/c görbét vennénk fel a rendszerben. Ennélfogva egy rosszul transzportálódó adenzin receptor agonista (pl. CPA) nem tud akkora hatást kiváltani ebben a rendszerben, mint amekkorát egy intakt rendszerben kiválthatna. Egy gyorsan metabolizálódó és transzportálódó adenzin receptor agonista (pl. adenzin) 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, valamint a jelen disszertációt megalapozó első vizsgálatunk során is a CBD-vel kezelt pitvarok esetén: gyengébb választ kaptunk minden CPA-koncentrációra, míg a kis és közepes adеноzin koncentrációkra erősebb, a nagy adеноzin koncentrációkra pedig változatlan válaszokat (a vivőanyaggal kezelt pitvarokhoz képest).

Kutatások szerint a CBD hatékonyan gátolja az ENT1-et. Ez a hatás erős, koncentráció-függő és már viszonylag kis CBD koncentrációnál (100 nM) kialakul. Eddig neuronokban, makrofágokban, valamint retina és agyi mikroglia sejtekben mutatták ki, de a szívben korábban még nem. Jelen kutatásunk az első, amely funkcionális bizonyítékot szolgáltat a CBD adеноzin transzport gátló hatásáról a szívizomban.

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 adеноzin többlet, az torzítani fogja az adеноzin 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). Korábban kidolgoztunk egy módszert, amellyel ez az E/c görbe torzulás korrigálható. Ezzel olyan E/c görbe hatás értékeket számolhatunk ki, amelyek információt adnak a torzulás okának nagyságáról, továbbá a valós válaszkészségről.

A korrigált CBD-kezelt CPA E/c görbe kb. 25% hatásról indult, ami azt jelzi, hogy a CBD legkevesebb az adеноzin EC₂₅ értékét halmozta fel a szívizom A₁ receptorainak mikrokörnyezetében. A korrigált CBD-kezelt adеноzin E/c görbe végső része pedig lényegesen erősebb maximális választ mutat, mint kontroll megfelelője. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a hosszú távú orális CBD kezelés folyamatos, mérsékelten emelkedett adеноzinerger aktivitást tart fenn a szívben, emellett fokozza az adеноzinra adott választ.

Meg kell jegyezni, hogy korrekciós módszerünk minden válaszcsökkenést egy extra, figyelembe nem vett agonista koncentrációnak tulajdonít. Az adеноzin 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. Ez összhangban van mások azon eredményeivel, miszerint az A₁ receptor lassan deszenzitizálódik, még jelentős mennyiségű teljes agonista jelenlétében is több hét szükséges hozzá. Ebből kiindulva korábbi vizsgálatainkban, melyek az adenosin transzport gátlásának akut következményeivel foglalkoztak, nem feltételeztük az A₁ receptor (valós) válaszkészségének csökkenését.

A jelen vizsgálatainkban alkalmazott négyhetes CBD kezelés azonban elég hosszú ahhoz, hogy mérlegelnünk kelljen az A₁ receptor deszenzitizációjának következményeit. 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. A hagyományosan kiértékelt adenosin E/c görbék kiértékelése alapján viszont azt láttuk, hogy a hosszú távú CBD kezelés vitathatatlanul növelte az adenosinra adott választ 1 nM-tól 10 µM-ig, ami kardioprotektív szempontból fontos koncentráció-tartomány. Ebből következően a hosszú távú orális CBD kezelés mindenképpen növelte a szív adenosinerg jelátvitelét, még akkor is, ha a szívizom A₁ adenosin receptorai bizonyos fokú downreguláción és/vagy deszenzitizáción mentek keresztül.

Az a megfigyelés, hogy a CBD jelenléte a szívben A₁ receptor aktivációhoz vezetett, felvetette annak lehetőségét, hogy a CBD A₁ receptor agonistaként működhet. Ha ez így van, akkor a CBD kezelt patkányok szívizomzatába kerülő CBD nem csak adenosin 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 adenosinra adott választ. Jelen vizsgálatunkban azonban az *in vivo* CBD kezelés csak a CPA-ra adott választ csökkentette, az adenosinra adott választ növelte (a virtuálisat is). Ebből következően a mi kísérleti körülményeink között a CBD inkább adenosin transzport gátlóként, mint adenosin receptor agonistaként viselkedett. Ez az eredmény funkcionális bizonyítékot jelent annak a kérdésnek az eldöntésében, hogy az adenosin transzport gátló vagy az adenosin receptor agonista tulajdonság uralja-e a CBD adenosinerg hatását a szívizomban.

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 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.

5. Összefoglalás

Vizsgálataink első szakaszában a munkacsoport korábbi *ex vivo* vizsgálatai során észlelt FSCPX paradoxont vizsgáltuk, 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.

Vizsgálataink második szakaszában 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.

6. 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).



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

- 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
- 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

- Viczján, G.**, Óvári, I., Erdei, T. D.: A kannabidiol és az adenosinerg rendszer kapcsolata.
Eü. Innov. Szle. 2 (2), 8-13, 2023.
- 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 érkekezés 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.

