

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A receptoriális válaszkészség módszer (RRM)
hasznosíthatósága és megbízhatósága, különös tekintettel az
agonisták és a biológiai rendszer tulajdonságainak befolyására**

Dr. Grenczer Mária

TÉMAVEZETŐ: Dr. Gesztelyi Rudolf



DEBRECENI EGYETEM
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2011.

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A receptoriális válaszkészség módszer (RRM)
hasznosíthatósága és megbízhatósága, különös tekintettel az
agonisták és a biológiai rendszer tulajdonságainak befolyására**

Dr. Grenszer Mária

TÉMAVEZETŐ: Dr. Gesztelyi Rudolf

DEBRECENI EGYETEM
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2011.

A receptoriális válaszkésztség módszer (RRM) hasznosíthatósága és megbízhatósága, különös tekintettel az agonisták és a biológiai rendszer tulajdonságainak befolyására

Értekezés tézisei a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: Dr. Greczer Mária gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskolája (Farmakológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Rudolf Gesztelyi (Ph.D.)

A doktori szigorlati bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Gergely Lajos (MTA doktora)

Tagok: Dr. Helyes Zsuzsanna (MTA doktora)

Dr. Bíró Tamás (Ph.D.)

A doktori szigorlat helye és időpontja:

DEOEC Gyógyszerhatástani Tanszék könyvtára, 2011. május 12. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Csont Tamás (Ph.D.)

Dr. Pórszász Róbert (Ph.D.)

A bírálóbizottság:

Elnök: Prof. Dr. Gergely Lajos (MTA doktora)

Tagok: Dr. Helyes Zsuzsanna (MTA doktora)

Dr. Bíró Tamás (Ph.D.)

Dr. Csont Tamás (Ph.D.)

Dr. Pórszász Róbert (Ph.D.)

Az értekezés védésének helye és időpontja:

DEOEC I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterme, 2011. május 12. 13 óra

1. Bevezetés és célkitűzés

A soksejtű élőlények sajátossága, hogy a sejtek közötti tér speciális „belső környezetet” (milieu interieur) képez, amely összetételében eltér mind a külső környezettől, mind az intracelluláris kompartmentektől. Az élőlények belső környezetének kialakulását és állandóságát (homeosztázis) számos, a belső környezetbe juttatott endogén szabályozó anyag biztosítja, melyek többsége farmakológiai értelemben receptor agonistának tekinthető.

A sejtműködés változásának mértéke, sőt bizonyos esetekben a jellege is függ az agonisták interstitialis koncentrációjától, amelynek fontos szabályozó szerepe van. A molekuláris biológia és a génterápia korában is egy agonista koncentrációja és a kiváltott hatás közötti kapcsolatot a legpontosabban koncentráció-hatás (E/c) görbe felvételével lehet meghatározni. A E/c görbe kiértékelésekor kritikus jelentőségű, hogy a koncentráció, amelyhez a hatást rendeljük, mely kompartmentre vonatkozik, ez ugyanis meghatározza, hogy a E/c görbe miről ad információt. Ideális esetben a figyelembe vett (ritkán mért, legtöbbször számolt) agonista koncentráció a receptorok mikrokörnyezetére (is) vonatkozik, vagyis a E/c görbe (az agonistán túl) a receptort illetve a posztreceptorális jelátviteli utakat jellemzi, és nem függ lényegesen a receptorokat tartalmazó szövet egyéb jellemzőitől (mint például az agonista diffúziójának akadályozása vagy az agonistát átalakító enzimek aktivitása).

Számos esetben azonban az adott agonista koncentrációjáról nem rendelkezünk megbízható információval specifikus kötődésük helyén. Ez különösen igaz a bomlékony agonistákra, melyek koncentrációját igen nehéz meghatározni receptoraik közelében, főleg működésben levő, mozgó szövetben. A receptorközeleli koncentráció ismerete ugyanakkor fontos az agonisták által befolyásolt biológiai folyamatok pontos feltérképezéséhez.

Egy a munkacsoportunk által a közelmúltban kifejlesztett koncentráció (pontosabban koncentrációkülönbség) meghatározó eljárás, a receptoriális válaszkészség módszer (receptorial responsiveness method; a továbbiakban: RRM) alkalmas lehet bomlékony agonisták receptorközeli koncentrációjának (pontosabban koncentrációváltozásának) becslésére működő szövetben. Az RRM kétváltozós nemlineáris regresszió, melynek alkalmazása során egy saját fejlesztésű egyenletet illesztve egy meghatározott módon felvett E/c görbére egyetlen regressziós paramétert becsülünk meg, ami vagy maga a keresett koncentráció(változás), vagy egy másik agonista azzal ekvifektív koncentrációja.

A E/c görbék elemzése során a receptorok stimulációját általában annak az exogén agonistának tulajdonítják, amellyel az adott E/c görbét felvették. Ha van is jelen a receptorok közelében más, pl. egy endogén agonista, azt rendszerint figyelmen kívül hagyják. Kis „extra” agonista mennyiség esetén annak torzító hatása a E/c görbe kiértékelésére valóban elhanyagolható. Ha azonban az adott rendszer ezt az extra agonistát olyan koncentrációban tartalmazza, amely jelentős mértékben képes stimulálni a receptorokat (és ezáltal „elhasználni” azok válasz-kapacitásának egy jelentős részét), az adott rendszerben az extra agonista jelenlétében felvett, az érintett receptorok stimulációján alapuló E/c görbe már elhanyagolhatatlan mértékben torzul. Munkacsoportunk korábban már leírta azt az összefüggést, amely kapcsolatot teremt az extrán jelenlévő agonista („torzító” agonista) koncentrációja és a másik agonistával („teszt” agonista) felvett E/c görbe torzulásának mértéke között (ld.: 15. oldal, 3.8. egyenlet).

A legegyszerűbb esetben a torzító és a teszt agonista ugyanaz a vegyület, de ez nem feltétele annak, hogy a fentebb említett összefüggést haszonnal alkalmazzuk. Ez annak köszönhető, hogy a legkülönbözőbb agonisták hatásai is (legalábbis részben) ugyanazokon a struktúrákon (receptorok, posztreceptorális jelátviteli elemek) összegződnek, amelyek válasz-kapacitása limitált. Ily módon

elegendő, ha csak arra törekszünk, hogy a teszt agonista jelátvittele minél nagyobb mértékben átfedjen a torzító agonistáéval, és ha van rá mód, ugyanazon a receptoron hasson mindkettő. Annak érdekében, hogy a két (adott esetben különböző) agonista szimultán hatását a legegyszerűbb módon tudjuk együtt kezelni, a fenti összefüggés (3.8. egyenlet) levezetésekor a torzító agonista koncentrációját (c_{bias}) a teszt agonista ekvieffektív koncentrációjával (c_x) helyettesítettük.

A fenti összefüggést (3.8. egyenlet) felhasználva kifejlesztettünk egy módszert, az RRM-et, amellyel a E/c görbe torzulásából kvantifikálható a torzító agonista koncentrációja. Amennyiben például egy endogén agonista a receptorok mikrokozonyezetében szabadul fel vagy szintetizálódik, illetve ha nagyon rövid féléletidővel bír, koncentrációját nehéz meghatározni, és általában nehéz bármilyen kvantitatív információhoz jutni róla. Ha azonban lehetőségünk van az adott rendszerben az endogén agonista felszabadulása (vagy szintézise) előtt és után egy-egy E/c görbét felvenni egy megfelelően hasonló agonistával, a két E/c görbe közötti különbség (vagyis a második görbe torzulása) információt fog hordozni a kérdéses endogén agonista koncentrációjáról. Ez az információ kinyerhető, ha a torzító koncentráció és a E/c görbe torulás közötti összefüggést (mint regressziós függvényt) a második E/c görbe adataira illesztjük.

A függvénynek tartalmaznia kell a teszt agonista koncentrációja és adott rendszerbeli hatása közötti torzítatlan kapcsolatot, melyet az első E/c görbe regressziójával kaphatunk meg (ha a regresszió során a Hill modellt illesztjük, ezek a paraméterek az E_{max} , EC_{50} és n). Ez természetesen azt jelenti, hogy a módszer által szolgáltatott becslés valójában a torzító agonista koncentrációjában beállt változás a két E/c görbe felvétele között. Az eljárás korlátai közül már a fentiekből is kiderül, hogy az eredmény csak akkor informatív, ha a meghatározás ideje alatt a receptorok nem deszenzitizálódnak, a torzító agonista koncentrációja állandó a második E/c görbe felvétele során, a teszt agonista pedig nem bomlékony és jól penetrál a rendszerben.

Ha a torzító és a teszt agonista ugyanaz, az RRM közvetlenül becsli a torzító agonista koncentrációját. Ha nem, az RRM azt a teszt agonista koncentrációt becsüli meg, amelyik egyenlő hatást fejt ki a torzító agonista koncentrációval. A teszt agonista stabilitása és jó diffúziós készsége nagyban növeli a meghatározás pontosságát. Ebből következően az, hogy az RRM megengedi a torzító és a teszt agonista különbözőségét, lehetővé teszi, hogy stabil agonisták felhasználásával bomlékonyságuk miatt nehezen meghatározható agonisták koncentrációjáról szerezzünk információt, még hozzá egy olyan nehezen megközelíthető szöveti kompartmentben, mint specifikus receptoraik mikrokörnyezete.

A torzító és a teszt agonista különbözősége esetén azonban felmerül a kérdés, hogy a két agonista eltérő tulajdonságai (pl. affinitás a receptorhoz; efficacy, vagyis a receptorhoz való kötődés utáni hatáskiváltó képesség) mennyiben érintik az RRM által szolgáltatott eredmények megbízhatóságát. Ennek a kérdésnek a tisztázása - elméleti érdekességén túl - gyakorlati jelentőséggel is bírhat, hiszen az RRM - bizonyos feltételek teljesülése esetén - egyedülálló lehetőséget ad a soksejtű szervezetek szabályozó működéseinek mennyiségi szempontú vizsgálatára a szabályozás célszövegeiben.

A jelen disszertáció első, *ex vivo* vizsgálatában az RRM-et nem koncentráció-meghatározásra használtuk fel: eu- és hyperthyreoid tengerimalac bal pitvaron vizsgáltuk az adenzin-dezamináz (ADA) gátlásának hatását az A₁ adenzin receptor (az A₁ receptor) negatív inotróp válaszkészségére. A kapott mérési eredmények értelmezéséhez azonban feltétlenül szükség volt az RRM elvének figyelembevételére.

A jelen disszertáció második, *in silico* vizsgálata során célunk az RRM segítségével kapható becslések megbízhatóságának vizsgálata volt eltérő tulajdonságú torzító és a teszt agonisták esetén, továbbá tanulmányozni kívántuk az agonisták hatását mediáló rendszer jellegének befolyását is. Arra törekedtünk, hogy a kérdéses jelenséget minél „tisztábban”, zavaró körülményektől mentesen

vizsgálhassuk. Ehhez a legmegfelelőbbnek a számítógépes szimulációt találtuk, amelyben egy megfelelően részletes kvantitatív receptor modell, az agonizmus operatív modellje segítségével előállítottuk a vizsgálni kívánt helyzeteket és kiviteleztuk az RRM-et (ugyanúgy, mintha biológiai adatokat elemeznénk). A kapott becsléseket összevetettük a szimuláció input adataival.

Második vizsgálatunkat három szakaszra bontottuk. Az elsőben csak a torzító koncentráció (a torzító agonista extra koncentrációja) nagyságának és a farmakológiai rendszer jellegének befolyását tanulmányoztuk az RRM pontosságára, ezért a torzító és a teszt agonista azonos tulajdonságokkal rendelkezett. A második szakaszban a torzító és a teszt agonista különbözőségének hatását vizsgáltunk, ezért eltérő affinitású és hatáslétrehozó képességű (efficacy) torzító és teszt agonistákat szimuláltunk. A harmadik szakaszban a második szakasz célkitűzése azzal bővült, hogy a szimulált E/c görbék esetleges aszimmetriájának hatását is fel kívántuk tárni.

2. *Ex vivo* metodika

2.1. Oldatok

Kísérleteinkhez a következő anyagokat használtuk: a módosított Krebs-Henseleit pufferhez (Krebs oldat) szükséges sók; adenzin; inozin; N⁶-cyclopentyladenosine (CPA); *erythro*-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine (EHNA); 2'-deoxycoformycin (pentostatin; DCF); az L-tiroxin Na-sójának pentahidrátja (T₄). A preparátumok tápoldata végig 36 °C-os Krebs oldat volt.

2.2. *In vivo* kezelés

Kísérleteinkhez 400-700 g testtömegű hím tengerimalacokat használtunk fel. Az állatok tartása, előkezelése és feldolgozása összhangban volt a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottságának Etikai Kódexében megfogalmazottakkal és az ide vonatkozó Európai Unió előírásokkal.

Az állatokat random módon két részre osztottuk: T₄ kezelt és oldószerkezelt (S kezelt) csoportra. A T₄ kezelt csoport tagjai 330 µg/testtömeg kg T₄-t kaptak naponta egyszer ip., míg az S kezelt csoport állatai a T₄ oldószerét kapták ip. (*in vivo* kezelés). A kezelés 8 napig tartott, az állatok felhasználása a 9. napon történt.

2.3. A bal pitvarok preparálása és előinkubációja

A tengerimalacokat guillotine segítségével lefejeztük, a bal pitvart izoláltuk, majd 10 cm³-es, Krebs oldattal feltöltött szervkádiban (TSZ-04, Experimetria, Budapest) felfüggesztettük. A Krebs oldatot 95% O₂ és 5% CO₂ elegyével oxigenáltuk, ami által pH-ja 7.4-re állt be. A pitvart egy fonálon

keresztül izometriás mechano-elektromos átalakító („transzducer”; SG-01 D, Experimetria, Budapest) érzékelőjéhez rögzítettük, majd a pitvart 10 mN alapfeszítés alá helyeztük, melyet a kísérlet folyamán (közvetlenül a mosások után) rendszeresen utánkorrigáltunk.

A pitvarokat programozható elektrostimulátorral (ST-02, Experimetria, Budapest) ingereltük pontszerűen kiképzett platina elektródokon keresztül. Az ingerlést 3 Hz frekvenciával, 1 ms impulzusszélesség mellett, másfélszeres küszöbfeszültséggel (kb. 1 V) végeztük. A kontrakciókkal arányos elektromos jeleket 6 csatornás poligráfon (BR-61, Medicor, Budapest) rögzítettük.

Az ingerlés megkezdése után valamennyi pitvart 50 percen keresztül előinkubáltuk Krebs oldatban, ami alatt a kontraktilitási paraméterek stabilizálódtak. A szervkádak oldatát 15-20 percenként cseréltük (mosás). Az S kezelt és T₄ kezelt csoportba tartozó pitvarokat random módon további 4-4 alcsoportba soroltuk az előinkubáció alatt (ld. később). A pitvarok izometriás összehúzódásait regisztráltunk, melyeknek az amplitúdóját tekintettük a kontrakciós erőnek.

2.4. Adenozin E/c görbék

Az előinkubáció után minden kísérleti alcsoportban elsőként kumulatív adenozin E/c görbét vettünk fel. Az adenozin alkalmas a T₄ kezelés validálására (markánsan csökkenti az adenozinerg választ), ugyanakkor igen rövid felezési ideje miatt gyorsan és teljesen eliminálódik a preparátumból, így a következő E/c görbét nem zavarja.

2.5. *In vitro* kezelés

Az adenzin kimosása után két protokoll egyikét hajtottuk végre a kialakított alcsoportokon. Az egyik protokoll szerint 60 perc inkubációra került sor (*in vitro* kezelés) a következő alcsoportokon:

1. S kezelt kontroll alcsoport (S Co; n = 7)
2. S és EHNA kezelt alcsoport (S EHNA; n = 7)
3. S és DCF kezelt alcsoport (S DCF; n = 8)
4. T₄ kezelt kontroll alcsoport (T Co; n = 7)
5. T₄ és EHNA kezelt alcsoport (T EHNA; n = 8)
6. T₄ és DCF kezelt alcsoport (T DCF; n = 8).

A másik protokollhoz tartozó alcsoportok esetében *in vitro* kezelés helyett csak 15-20 perces mosás következett:

1. S kezelt alcsoport (S Ø; n = 4)
2. T₄ kezelt alcsoport (T Ø; n = 4).

2.6. CPA E/c görbék

Az *in vitro* kezelést kapott hat alcsoport pitvarain kumulatív E/c görbét vettünk fel CPA-val, amely igen szelektív A₁ receptor agonista. Mivel a CPA nem szubsztrátja a myocardiumban található adenzin-bontó illetve újrahaznosító enzimeknek, vérmentes pitvarszövetben a E/c görbe felvétele alatt (20-40 perc) alig csökken a koncentrációja. Emiatt azonban nehezen távolítható el a pitvarból, ezért hoztunk létre külön kontroll csoportokat az önkontrollos elrendezés helyett.

2.7. Inozin E/c görbék

Az *in vitro* kezelés nélküli két alcsoport pitvarain inozinnal vettünk fel kumulatív E/c görbét. Az inozin képes befolyásolni a szív adenzinerg rendszerét, ezért vizsgáltuk az általa kifejtett direkt inotróp hatást.

2.8. A kontrakciós erők és a E/c görbék feldolgozása

Az intakt kontrakciós erőt az első E/c görbe kiindulási kontrakciós erejeként határoztuk meg. Az *in vitro* kezelés hatására kialakult kontrakciós erőt az intakt kontrakciós erő százalékában fejeztük ki a kezeléshez használt szer inotróp hatásának jellemzésére.

A E/c görbék felvétele során egy adott agonista koncentráció hatásának a kontrakciós erő legnagyobb csökkenését vettük a kiindulási kontrakciós erő százalékában. A E/c görbék pontjaira a Hill egyenletet illesztettük, az egyes preparátumok válaszkészségét az adott agonista E/c görbéjének E_{max} , $\log EC_{50}$ és n paramétereivel jellemeztük.

2.9. Statisztikai elemzés

Két csoport számtani közepeinek összehasonlításához kétoldalú kétmintás párosítatlant Student-féle t tesztet használtunk. Kettőnél több csoport összehasonlítását kétutas varianciaanalízissel (ANOVA) végeztük, melyet Bonferroni poszt-teszttel egészítettünk ki. A véletlen oki szerepét $p < 0.05$ esetén vetettük el.

A E/c görbék esetében egyrészt az azonos koncentrációkhoz tartozó, alcsoportonként átlagolt hatásokat hasonlítottuk össze, másrészt a Hill egyenlet illesztésével nyert E_{max} , $\log EC_{50}$ és n értékeket.

3. *In silico* metodika

A szimuláció során először agonistákat és farmakológiai rendszereket definiáltunk, majd megszerkesztettük az agonisták E/c görbéit és jellemeztük ezeket. Ezt követően olyan E/c görbéket szerkesztettünk, amelyek agonista-párok szimultán hatását jelenítették meg ugyanabban a rendszerben. Az agonista párok egyik tagját állandó koncentrációval vettük figyelembe, mint torzító agonistát, míg a másiktól felszálló koncentráció sort képeztünk, mint teszt agonistából. Ezután a E/c görbéket úgy transzformáltuk, mintha a torzító koncentrációkat figyelmen kívül hagytuk volna felvételük során. Ezt követően az RRM alkalmazásával meghatároztuk a torzító koncentrációkat a transzformált (torzított) E/c görbék és a teszt agonisták egyedüli hatását reprezentáló E/c görbék felhasználásával. Ha a torzító és a teszt agonista azonos volt, a görbeillesztéssel kapott regressziós paramétereket közvetlenül használtuk fel, ha nem, a regressziós paramétereket még átszámoltuk torzító agonista koncentrációvá. Végezetül az így kapott becsléseket összehasonlítottuk azokkal a torzító agonista koncentrációkkal, amelyeket a szimuláció során használtunk, mint input adatot. Emellett a farmakológiai rendszer hatását is vizsgáltuk az RRM pontosságára oly módon, hogy a E/c görbék szimulációját többféle meredekségi faktor mellett is elvégeztük. A harmadik vizsgálati szakaszban az RRM során két egyenletet is használtunk görbeillesztésre. Közülük az egyik az RRM hagyományos egyenlete, míg a másikat a jelen disszertációban tárgyalt vizsgálatok során vezettük le arra a célra, hogy figyelembe tudja venni az illesztett E/c görbék esetleges aszimmetriáját.

3.1. Torzítatlan, egyagonistás E/c görbék szerkesztése

Agonistákat és farmakológiai rendszereket definiáltunk az agonizmus operatív modelljének keretein belül, majd ezek alapján hatás értékeket számoltunk ki az operatív modell alapegyenlete segítségével:

$$E = E_m \cdot \frac{[R_0]^{n_{op}} \cdot c^{n_{op}}}{K_E^{n_{op}} \cdot (K + c)^{n_{op}} + [R_0]^{n_{op}} \cdot c^{n_{op}}} \quad 3.1.$$

ahol: E a hatás; E_m a legnagyobb elérhető hatás az adott rendszerben; $[R_0]$ a receptor koncentráció; c az agonista koncentráció; K az agonista-receptor komplex egyensúlyi disszociációs konstansa (az agonista affinitásának reciprok mértéke); K_E az agonista kötődés utáni hatáskiváltó képességének (efficacy) reciprok mértéke; n_{op} az operatív meredekségi tényező (operational slope factor).

A fenti egyenlet segítségével számolt hatásokat a megfelelő agonista koncentrációjának függvényében ábráztuk, mint az agonisták „torzítatlan” E/c görbéit.

3.2. A Hill és a Richards egyenlet illesztése a torzítatlan, egyagonistás E/c görbékre

A Hill egyenletet (3.2.) és a Richards egyenletet (3.3.) a szimulált agonisták torzítatlan E/c görbéjére illesztettük:

$$E = \frac{E_{\max}}{1 + 10^{n \cdot (\log EC_{50} - \log c)}} \quad \text{és} \quad E = \frac{E_{\max}}{\left(1 + 10^{n \cdot (\log X_b - \log c)}\right)^S} \quad 3.2. \text{ és } 3.3.$$

ahol (a még nem definiált paraméterek): E_{\max} az adott agonistával elérhető legnagyobb hatás az adott rendszerben; EC_{50} a félhatásos koncentráció (a függvény középpontja); n a Hill koefficiens (Hill-féle meredekségi tényező); S a szimmetria tényező (ha különbözik 1-től, a függvény aszimmetrikus, vagyis a középpont és az inflexiós pont nem esik egybe); X_b egy az eddigiekre visszavezethető paraméter: $X_b = EC_{50} \cdot (2^{1/S} - 1)^{1/n}$.

Az illesztett Hill és Richards egyenlet regressziós paramétereit a teszt agonista esetén a későbbiekben felhasználtuk az RRM-hez.

3.3. Torzítatlan, kétagonistás E/c görbék szerkesztése

Az egyes torzító és teszt agonista párok szimultán hatását az alábbi egyenlettel számoltuk ki:

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

3.4.

ahol (a még nem említett paraméterek): c_{test} a teszt agonista koncentrációja; c_{bias} a torzító agonista koncentrációja; K_{test} a teszt agonista K értéke; K_{bias} a torzító agonista K értéke; τ_{test} a teszt agonista operatív hatékonysága (operational efficacy), ami a teszt agonista kötődés utáni hatáskiváltó képességének mértéke ($\tau_{test} = [R_0]/K_{Etest}$); τ_{bias} a torzító agonista operatív hatékonysága ($\tau_{bias} = [R_0]/K_{Ebias}$).

Az EC_{50} -et az operatív modellből kiindulva az alábbi egyenlet alapján számoltuk:

$$EC_{50} = K \cdot \frac{1}{\left(2 + \tau^{n_{op}}\right)^{\frac{1}{n_{op}}} - 1} \quad 3.5.$$

A többi EC_F értéket a megfelelő EC_{50} -ból és n_{op} -ból számoltuk ki a következő egyenlet segítségével:

$$EC_F = EC_{50} \cdot \left(\frac{F}{100 - F}\right)^{\frac{1}{n_{op}}} \quad 3.6.$$

Ha a 3.4. egyenlettel számolt hatásokat a c_{test} és c_{bias} összegének függvényében ábrázolnánk, a kapott függvények az együtt ható agonisták torzítatlan E/c görbéi lennének.

3.4. A kétagonistás E/c görbék torzítása

A 3.4. egyenlettel számolt hatásokat transzformáltuk (torzítottuk) az alábbi egyenlet segítségével:

$$E' = 100 - \frac{100 \cdot (100 - E)}{100 - E_{bias}} \quad 3.7.$$

ahol (a még nem említett paraméterek): E' a torzult hatás; E a 3.4. egyenlettel számolt (torzítatlan) hatás; E_{bias} a c_{bias} által kiváltott hatás (a 3.4. egyenlettel számolva oly módon, hogy a c_{test} nulla, de minden más paraméter ugyanaz, mint a hozzá tartozó E esetében).

A 3.7. egyenlettel végzett transzformáció tehát azt szimulálja, hogy egy figyelmen kívül hagyott c_{bias} van a rendszerben, ami létrehozott egy figyelmen

kívül hagyott E_{bias} hatást. Ennek megfelelően a 3.7. egyenlettel kapott torzult hatásokat csak a c_{test} függvényében ábrázoltuk, ami torzult E/c görbékét hozott létre (teljesen mellőzve a c_{bias} -t és az E_{bias} -t).

3.5. Az RRM egyenleteinek illesztésre a torzult, kétagonistás E/c görbékre

A torzult E/c görbékre a 3.8. egyenletet és a 3.9. egyenletet illesztettük:

$$E' = 100 - \frac{100 \cdot \left(100 - \frac{E_{\text{max}}}{1 + 10^{n \cdot (\log EC_{50} - \log(10^{\log c_x} + 10^{\log c_{\text{test}}})}} \right)}{100 - \frac{E_{\text{max}}}{1 + 10^{n \cdot (\log EC_{50} - \log c_x)}}} \quad 3.8.$$

$$E' = 100 - \frac{100 \cdot \left(100 - \frac{E_{\text{max}}}{\left(1 + 10^{n \cdot (\log X_b - \log(10^{\log c_x} + 10^{\log c_{\text{test}}})} \right))^S \right)}{100 - \frac{E_{\text{max}}}{\left(1 + 10^{n \cdot (\log X_b - \log c_x)} \right)^S}} \quad 3.9.$$

ahol (a még nem definiált paraméterek): c_x az a teszt agonista koncentráció, amelyet azonos hatásúnak várunk a c_{bias} koncentrációval (a c_x a 3.8. és a 3.9. egyenletek által szolgáltatott egyedüli regressziós paraméter); a 3.8. egyenletbe beírt E_{max} , $\log EC_{50}$ és n a Hill egyenlet illesztésével kapott paraméterek; a 3.9. egyenletben látható E_{max} , $\log X_b$, n , S a Richards egyenlet illesztése során kapott paraméterek.

A c_x értékeket a 3.1. egyenlet segítségével átszámoltuk becsléssé, vagyis azon torzító agonista koncentrációvá, amelynek egyenlőnek kell lennie a c_{bias} -szel. A kétféle egyenlettel kivitelezett koncentrációbecslés pontosságának

kifejezésére és összehasonlítására kiszámoltuk a becslések százalékos eltérését a nekik megfelelő c_{bias} értékektől: $((\text{becslés} - c_{\text{bias}}) / c_{\text{bias}}) * 100\%$.

3.6. Számítógépes szimuláció és adatelemzés

A függvények y értékeit és a nem görbeillesztéssel nyert paramétereket Microsoft Excel 2003 szoftverrel számítottuk ki. Görbeillesztésre GraphPad Prism 4.03 for Windows szoftvert használtunk.

4. Eredmények

4.1. Az ADA gátlás hatása az A₁ receptor mediálta negatív inotrópiára eu- és hyperthyreoid tengerimalac bal pitvaron

Az inozin nem befolyásolta érdemben pitvarok kontrakciós erejét. Az adenzin és a CPA viszont koncentrációfüggő negatív inotróp hatást hozott létre, amely kisebb volt a T₄ kezelt pitvarokon.

Az S kezelt alcsoportok közötti különbségek nem érték el a statisztikai szignifikancia szintjét sem a regressziós paraméterek, sem az egyes CPA koncentrációkra adott válaszok esetében. A T₄ kezelés ezzel szemben felerősítette az EHNA és a DCF hatását: az EHNA szignifikánsan növelte az E_{max}-ot, míg a DCF szignifikánsan csökkentette a logEC₅₀-et. Noha az EHNA is csökkentette a logEC₅₀-et és a DCF is növelte az E_{max}-ot a T₄ kezelt pitvarokon, ezek a hatások statisztikailag nem voltak szignifikánsak.

4.2. Az affinitás, a jelátviteli hatékonyság és az operatív meredekségi tényező befolyása az RRM pontosságára

4.2.1. Az RRM megbízhatósága a teszt agonista és a torzító agonista azonossága esetén

Az RRM $n_{op} = 0.5$ által definiált rendszerben illesztett egyenlete kis és közepes teszt agonista koncentrációknál (c_{test}) az adatpontok alatt futott, míg nagy c_{test} koncentrációknál az adatpontok felett. Ezzel az illesztett egyenlet lefutását a torzított E/c görbe adatpontokhoz képest „alatta majd felette” jellegűnek minősíthetjük. Kis és közepes torzító agonista koncentrációknál (c_{bias})

a becslés viszonylag pontos volt, nagyobb c_{bias} értékeknél azonban a becslések százalékos eltérése a c_{bias} értékektől lényegesen meghaladta a 100%-ot.

Az RRM egyenletének illeszkedése és a becslés pontossága $n_{\text{op}} = 1$ esetén volt a legjobb. Az illesztett függvény láthatólag minden E/c görbe adatpontot tartalmazott. A százalékos eltérés minden c_{bias} értéknél 0% és 100% között maradt, mi több, a két legkisebb c_{bias} kivételével nem haladta meg a 10%-ot.

Az $n_{\text{op}} = 1.5$ rendszerben a görbeillesztés megghiúsult a két legkisebb c_{bias} érték esetében. Az illesztett egyenlet „felette majd alatta” típusú volt. Másrészt viszont a becslés csaknem olyan jó volt, mint $n_{\text{op}} = 1$ esetében, a százalékos eltérés -100% és 10% között mozgott.

Érdekes módon az RRM a kisebb és a nagyobb c_{bias} értékeket alulbecsülte $n_{\text{op}} = 1.5$ esetén, míg túlbecsülte $n_{\text{op}} = 0.5$ mellett. Ezzel szemben $n_{\text{op}} = 1$ esetében csak a legkisebb c_{bias} -t becсsülte túl.

A görbeillesztés precizitása és a becslés pontossága között csak laza korreláció mutatkozott.

4.2.2. Az RRM megbízhatósága a teszt agonista és a torzító agonista különbözősége esetén

A második vizsgálati szakasz agonistáit operatív hatékonyságuk (τ) alapján a következő csoportokba soroltuk: A, B, C csoport ($\tau = 10$); D, F, H csoport ($\tau = 1$); és E, G, I csoport ($\tau = 100$). Az RRM az ugyanakkora τ -val rendelkező agonisták ugyanazon torzító koncentrációit (EC_{25} , EC_{50} illetve EC_{75}) ugyanabban a rendszerben (ugyanazon n_{op} mellett) ugyanazzal a c_x értékkel jellemezte, tehát az affinitás nem befolyásolta a kapott c_x értékeket. Amikor a közös c_x -ből becslést számoltunk, ez utóbbiak csak a nagyságrendjükben különböztek egymástól, a torzító agonistákhoz tartozó K_{bias} értékeknek megfelelően.

A teszt agonista és a torzító agonista operatív hatékonyságának együttes figyelembevételére képeztünk ezek arányát: $\tau_{\text{bias}}/\tau_{\text{test}}$. Az RRM egyenletének legjobb illeszkedését és a legpontosabb becslést az A, B, C csoport ($\tau_{\text{bias}}/\tau_{\text{test}} = 1$) esetében tapasztaltuk $n_{\text{op}} = 1$ mellett (a százalékos eltérés 2-3% volt). Az n_{op} csökkentése „alatta majd felette” jellegűvé tette az illesztett egyenletet, míg az n_{op} növelése „felette majd alatta” típusúvá, különösen nagyobb c_{bias} értékeknél. Ezzel összhangban a becslési pontosság is romlott az $n_{\text{op}} = 1$ rendszerben tapasztaltakhoz képest, de még viszonylag jó maradt (a százalékos eltérés $\pm 20\%$ -on belül volt $n_{\text{op}} = 0.5$ mellett, míg $\pm 10\%$ -on belül alakult $n_{\text{op}} = 1.5$ mellett) az A, B, C csoport esetében.

A D, F, H csoportnál ($\tau_{\text{bias}}/\tau_{\text{test}} = 0.1$) $n_{\text{op}} = 1$ esetén az illesztett egyenlet „felette majd alatta” típusú lett, amely még kifejezettebbé vált az $n_{\text{op}} = 1.5$ rendszerben. Ezzel szemben $n_{\text{op}} = 0.5$ esetén a görbeilleszkedés megjavult, a „felette majd alatta” jelleg csak nagyobb c_{bias} értékeknél nyilvánult meg. Ezzel összhangban az $n_{\text{op}} = 1$ és az $n_{\text{op}} = 1.5$ rendszerekben az RRM durván túlbecsülte a c_{bias} értékeket, de csak mérsékelten mért fölējük az $n_{\text{op}} = 0.5$ rendszerben (a százalékos eltérés 10% és 100% között volt). Nagyobb c_{bias} és egyidejű nagyobb n_{op} esetében a kapott c_x -ből nem lehetett becslést számolni, mivel a c_x -hez tartozó hatás (E_x) meghaladta a torzító agonista saját (torzítatlan, egyagonistás) E/c görbéjének E_{max} -át.

Az E, G, I csoportnál ($\tau_{\text{bias}}/\tau_{\text{test}} = 10$) $n_{\text{op}} = 1$ mellett az RRM egyenletének illeszkedése viszonylag jó volt, nagyobb c_{bias} értékeknél azonban „alatta majd felette” jellegűvé vált. Az n_{op} csökkentése rontotta, míg növelése javította (csaknem tökéletessé tette) az illeszkedést, szemben a D, F, H csoportban látott viselkedéssel. Az E, G, I csoportnál a becslési pontosság viszonylag jó volt, a százalékos eltérés -20% és 20% között alakult $n_{\text{op}} = 0.5$ esetén, -10% és 0% között volt $n_{\text{op}} = 1$ mellett, valamint -20% és 0% között volt $n_{\text{op}} = 1.5$ esetén.

4.2.3. A E/c görbe aszimmetria figyelembevételének hatása az RRM megbízhatóságára

Amikor a E/c görbék szimmetrikusak voltak ($n_{op} = 1$), a Hill illetve a Richards egyenletet magába foglaló RRM becslései megegyeztek. Az $n_{op} = 0.5$ rendszerben a Richards modellt tartalmazó RRM általában pontosabb volt, mint a Hill modellt magába foglaló RRM. Érdekes módon $n_{op} = 2$ mellett a Richards modellt tartalmazó RRM rendre ugyanolyan vagy némileg pontatlanabb becslésekkel szolgált, mint a Hill egyenletet tartalmazó. Mindent egybevetve, nem találtunk lényeges különbséget a kétféle modellt tartalmazó RRM becslései között a E/c görbék aszimmetriája ($n_{op} \neq 1$) esetén sem.

A D agonista ($\tau_{bias}/\tau_{test} = 1$) meghatározása során az $n_{op} = 1$ rendszerben tökéletes becsléseket kaptunk, a százalékos eltérés minden c_{bias} esetében 0% volt. Ezzel összhangban az RRM egyenletei láthatóan az összes E/c görbe adatpontot tartalmazták. Más agonisták és más rendszerek esetében a becslési pontosság és az illeszkedés általában rosszabb volt.

A τ_{bias}/τ_{test} arány növelése az illesztett egyenleteket egyaránt az „alatta majd felette” jelleg irányába módosította, a τ_{bias}/τ_{test} arány csökkentése pedig „felette majd alatta” irányába. Ezzel szemben az n_{op} növelése az illesztett egyenleteket „felette majd alatta” irányába transzformálta, az n_{op} csökkentése pedig „alatta majd felette” irányába. A τ_{bias}/τ_{test} arány és az n_{op} ezen hatása additív volt, hasonlóan a második vizsgálati szakaszban tapasztaltakhoz.

Az RRM egyenleteinek „alatta majd felette” típusú lefutása csaknem tökéletes becslési pontossággal járt. Ezzel szemben a „felette majd alatta” jellegű lefutás pontatlanabb becsléssel párosult, különösen, ha az egyenletek illeszkedése is feltűnően rossz volt.

Néhány esetben, amikor a τ_{bias}/τ_{test} arány és a c_{bias} nagy volt, az n_{op} pedig kicsi, a E/c görbe negatív lefutást mutatott. Ekkor az RRM egyenletét nem

lehetett illeszteni, így nem sikerült c_x -et nyerni. A Richards modell alkalmazása egyáltalán nem befolyásolta ezt a hibát.

A harmadik szakasz során tehát bebizonyosodott, hogy a $\tau_{\text{bias}}/\tau_{\text{test}} \neq 1$ és/vagy $n_{\text{op}} \neq 1$ okozta görbeilleszkedési torzulás, csakúgy, mint a becslési pontosság ehhez kapcsolódó változása, lényegében nem védhető ki a E/c görbék aszimmetriájának figyelembe vételével.

5. Megbeszélés

5.1. A thyreoid hormonok és az ADA gátlók interakciója a tengerimalac bal pitvari adozinerg rendszeren

Az első (*ex vivo*) vizsgálatban kimutattuk, hogy az ADA és cGMP-stimulálta 3',5'-ciklikus nukleotid foszfodiészteráz (PDE2) gátló EHNA erőteljesebben növelte a szelektív A₁ receptor agonista CPA maximális inotróp hatását hyperthyreoid tengerimalac pitvaron, mint a szelektív ADA inhibitor DCF, ami megerősítette a munkacsoport azon korábbi eredményét, hogy hyperthyreosisban a PDE2 gátlás növeli a CPA hatását. A DCF ugyanakkor kismértékben, de statisztikailag szignifikánsan csökkentette a CPA EC₅₀ értékét hyperthyreoid tengerimalac pitvaron. Mivel a CPA nem szubsztrátja az ADA-nak, a CPA-ra adott válasz növekedése nem írható egy ADA gátlás miatti csökkent CPA bomlás számlájára. Eredményeink arra utalnak, hogy az ADA gátlása fokozza a hyperthyreoid A₁ receptor és/vagy a posztreceptorális jelátvitel hatékonyságát, amivel közelíti azt az euthyreoid szinthez. A jelenség hátterében felvethető az intracelluláris adozin koncentráció növekedése, ugyanakkor valószínűtleníthető az extracelluláris adozin-szint emelkedésének szerepe.

5.2. Az agonisták és receptorális rendszerek tulajdonságainak befolyása az RRM megbízhatóságára

Az *in silico* vizsgálat első szakasza során a c_x értékek figyelemreméltó pontossággal becsülték meg a c_{bias} -t mindhárom rendszerben ($n_{op} = 0.5; 1; 1.5$) az agonista saját E/c görbéjének kb. EC₂₅ és EC₇₅ értékei között. Ezen az intervallumon kívül a becslési pontosság csak $n_{op} = 1$ mellett volt jó, 1-nél

nagyobb vagy kisebb n_{op} esetén látványosan romlott, különösen nagy c_{bias} és egyidejű kis n_{op} esetében. Vagyis, az n_{op} által megjelenített rendszer-tulajdonság befolyásolja ugyan az RRM megbízhatóságát, de csak marginális koncentrációknál (amelyek túl kicsi vagy túl nagy hatást váltanak ki).

A második szakasz alapján kijelenthetjük, hogy bizonyos esetekben az RRM elfogadhatóan pontos becslést képes adni a c_{bias} -ról akkor is, ha a torzító és a teszt agonista eltérő affinitással illetve kötődés utáni hatáskiváltó képességgel rendelkeznek (a két agonistáról a jelen vizsgálatban feltételeztük, hogy ugyanahhoz a receptorhoz kötődnek). Fontos ugyanakkor, hogy, ha már az RRM nem is szolgáltat minden esetben elfogadhatóan pontos becslést, az RRM egyenletének lefutásából (a E/c görbe adatpontjaihoz képesti helyzetéből) következtetni lehet a becslések megbízhatóságára, továbbá arra, hogyan lehet megbízhatóbb eredményhez jutni.

A harmadik szakasz eredményei szerint a E/c görbe aszimmetria figyelembevétele az RRM alkalmazása során nem hoz átütő javulást a becslési pontosság terén, emellett lényegében nem befolyásolta azokat a hibákat, amelyek néhány esetben lehetetlenné tették becslések meghatározását. Ez azt jelenti, hogy nincs okunk lecserélni az RRM eddig használt egyenletét egy bonyolultabbra csak azért, hogy alkalmazkodjunk a E/c görbék általában nem túl nagyfokú aszimmetriájához.

A második vizsgálat alapján megállapíthatjuk, hogy az RRM megfelelően kivitelezve alkalmas lehet endogén agonisták koncentráció-változásainak meghatározására azok receptorainak mikro környezetében. Az RRM sikeres alkalmazásának korábban feltárt feltételeit a következőkkel egészíthetjük ki:

1. A teszt agonista adott rendszerbeli E_{max} -ának érdemes közel lennie a torzító agonista E_{max} -ához, mivel ebben az esetben, ha a c_x a teszt agonista saját E/c görbéjének középső szakaszára esik, a c_{bias} is a középső szakaszra fog esni a torzító agonista saját E/c görbéjén.

2. Ha az RRM illesztett egyenlete látványosan „alatta majd fölötte” fut a torzult E/c görbe pontjainak, a koncentráció-meghatározást érdemes megismételni egy nagyobb hatáskiváltó képességű teszt agonistával. Amennyiben viszont „fölötte majd alatta” lefutást tapasztalunk, a becsléseket különösen óvatosan kell kezelni és a meghatározást ajánlott megismételni egy kisebb hatáskiváltó képességű teszt agonistával.

3. Ha a teszt agonista koncentráció-függő negatív hatást vált ki, a meghatározást egy nagyobb hatáskiváltó képességű teszt agonistával kell megismételni.

6. Összefoglalás

1. *Ex vivo* állatkísérletes vizsgálataink során ADA gátló EHNA és DCF jelenlétében egyaránt erősödött a CPA negatív inotróp hatása hyperthyreoid tengerimalac pitvaron, miközben alig változott euthyreoid pitvaron. Mivel a CPA bomlását az ADA nem katalizálja, a jelenség hátterében a hyperthyreoid pitvari A₁ receptor válaszkészségének fokozódását tételezzük fel az ADA gátlás hatására.

2. *In silico* vizsgálatunk során megállapítottuk, hogy ha a torzító és a teszt agonista azonos, a torzító agonista EC₂₅ és EC₇₅ közötti koncentrációinak becslése minden vizsgált n_{op} esetén elfogadható. Amennyiben az n_{op} ≠ 1, a torzító agonista <EC₂₅ és >EC₇₅ koncentrációinál a becslések pontatlanná válnak.

3. Ha a torzító és a teszt agonista különböző, eltérő affinitásuk nem befolyásolja az RRM pontosságát, eltérő efficacy értékük viszont igen. Ha az RRM E/c görbe adatpontokra illesztett egyenlete kis teszt agonista koncentrációknál markánsan a E/c görbe adatpontok fölött fut, nagyobb teszt agonista-szinteknél pedig alattuk, a becsléseket óvatosan kell kezelni és a koncentráció-meghatározást érdemes megismételni egy kisebb efficacy értékű teszt agonistával.

4. A teszt agonista ésszerű efficacy-tartományának alsó határát az a jelenség jelöli ki, amikor a c_{bias} jelenlétében a teszt agonista dózisfüggő negatív hatást vált ki, amelyre az RRM egyenletét nem lehet illeszteni.

5. A koncentráció-hatás görbék aszimmetriájának figyelembevétele az RRM eredeti egyenletének módosításával nem javítja lényegesen az RRM becslési pontosságát és nem korrigálja az RRM jellemző hibáit sem. Emiatt nincs okunk az RRM Hill modellt tartalmazó egyenletét bonyolultabbra cserélni.

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Kemeny-Beke A, Jakab A, Zsuga J, Vecsernyes M, Karsai D, Pasztor F, **Grenczer M**, Szentmiklosi AJ, Berta A, Gesztelyi R. Adenosine deaminase inhibition enhances the inotropic response mediated by A1 adenosine receptor in hyperthyroid guinea pig atrium. *Pharmacol Res.* 2007; 56: 124-131. (IF: 1.895)

Grenczer 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.* 2010; 88: 1061-1073. (IF: 1.341)

Grenczer 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.* 2010; 88: 1074-1083. (IF: 1.341)

Poszterek és absztraktok

Gesztelyi R, Zsuga J, **Grenczer M**, Jakab A, Szabó G, Juhász B, Lekli I, Vecsernyés M, Tósaki Á. Az adenzin dezamináz pentostatin általi gátlása növeli az M₂ muszkarin receptorok ingerlésével kiváltható negatív inotróp választ tiroxinkezelt tengerimalacok bal pitvarán. MÉT LXXI. Vándorgyűlése, Pécs 2007, p. 161.

Gesztelyi R, Juhász B, Zsuga J, **Grenczer M**, Jakab A, Vecsernyés M, Tósaki Á. A tiroxinkezelés hatása az A₁ adenzin receptorok 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (CPX) általi gátolhatóságára tengerimalac bal pitvaron. MÉT LXXII. Vándorgyűlése, Debrecen 2008, p. 202.

Gesztelyi R, Hegedüs B, **Grenczer M**, Zsuga J, Kemény-Beke Á, Varga B, Juhász B, Tósaki Á. Három A₁ adenzin receptor agonista (NECA, CPA, CHA) receptor rezervjének meghatározása a negatív inotróp hatásra nézve izolált tengerimalac bal pitvaron. MÉT LXXIII. Vándorgyűlése, Budapest 2009, C/30.

Gesztelyi R, Zsuga J, Hegedüs B, **Grenczer M**, Varga B, Juhász B, Kemény-Beke Á, Szentmiklósi AJ, Tósaki Á. Az olajmentes meggy-mag-kivonat hatása az acetilkolin és az adenzin-trifoszfát kiváltotta endothel-függő relaxációra izolált tengerimalac truncus pulmonalis-on. MÉT LXXIV. Vándorgyűlése, Szeged 2010, P70.