

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

Dr. Kiss Zsuzsanna

**Az A<sub>1</sub> adenozin receptor tiroxinnal szembeni  
érzékenységének és a direkt negatív inotróp  
hatáshoz tartozó receptor rezervjének  
meghatározása tengerimalac pitvaron**

DEBRECENI EGYETEM  
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA  
DEBRECEN, 2013.

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**Az A<sub>1</sub> adenozin receptor tiroxinnal szembeni  
érzékenységének és a direkt negatív inotróp  
hatáshoz tartozó receptor rezervjének  
meghatározása tengerimalac pitvaron**

Dr. Kiss Zsuzsanna

TÉMAVEZETŐ: Dr. Gesztelyi Rudolf



DEBRECENI EGYETEM  
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA  
DEBRECEN, 2013.

*A világhoz nem alkalmazkodni kell, ... hanem hozzáadni.*

*Ottlik Géza*

# Tartalomjegyzék

<b>1. Bevezetés és célkitűzés.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Irodalmi áttekintés .....</b>	<b>6</b>
2.1. Az adenzin és az adenzin receptorok.....	6
2.2. A purinerg transzmisszió felfedezése .....	8
2.3. A <sub>1</sub> adenzin receptor agonisták, antagonisták és modulátorok .....	10
2.4. A receptor rezerv .....	13
2.5. Az A <sub>1</sub> adenzin receptor rezerv jelentősége.....	16
2.6. A pitvari A <sub>1</sub> adenzin receptor negatív inotróp hatása.....	17
2.7. A thyreoid hormonok hatása a pitvari A <sub>1</sub> adenzin receptor mediálta negatív inotrópiára.....	19
2.8. A felhasznált kvantitatív farmakodinámiai modellek.....	22
2.8.1. A Hill egyenlet.....	22
2.8.2. A Schild egyenlet .....	25
2.8.3. Az agonizmus operatív modellje .....	27
2.8.4. A Furchgott módszer .....	30
2.8.5. A receptoriális válaszkészség módszer (RRM).....	31
<b>3. Anyagok és módszerek .....</b>	<b>35</b>
3.1. Vegyszerek és oldatok .....	35
3.2. Állatok és preparátumok.....	35
3.2.1. <i>In vivo</i> tiroxin-kezelés .....	36
3.2.2. A bal pitvarok preparálása .....	36
3.3. Kísérleti protokollok és csoportok.....	36
3.3.1. Az A <sub>1</sub> adenzin receptor CPX iránti affinitásának vizsgálata adenzinnal .....	38
3.3.2. Az A <sub>1</sub> adenzin receptor CPX iránti affinitásának vizsgálata CPA-val.....	38
3.3.3. Az FSCPX tulajdonságainak vizsgálata izolált pitvaron .....	39
3.3.4. Az A <sub>1</sub> adenzin receptor rezerv vizsgálata NECA-val, CPA-val és CHA-val .....	39
3.3.5. Az A <sub>1</sub> adenzin receptor rezerv vizsgálata adenzinnal: első próbálkozás .....	40
3.3.6. Az A <sub>1</sub> adenzin receptor rezerv vizsgálata adenzinnal: második próbálkozás .....	40
3.3.7. Az A <sub>1</sub> adenzin receptor rezerv vizsgálata adenzinnal: harmadik próbálkozás .....	41
3.4. A koncentráció-hatás görbék kiértékelése .....	41
3.5. Az A <sub>2</sub> illetve a K <sub>B</sub> meghatározása .....	43
3.6. A K <sub>A</sub> meghatározása.....	43
3.6.1. A K <sub>A</sub> becslése az operatív modell felhasználásával .....	43
3.6.2. A K <sub>A</sub> becslése Furchgott módszerével .....	44
3.7. A százalékos receptor okkupancia meghatározása.....	45

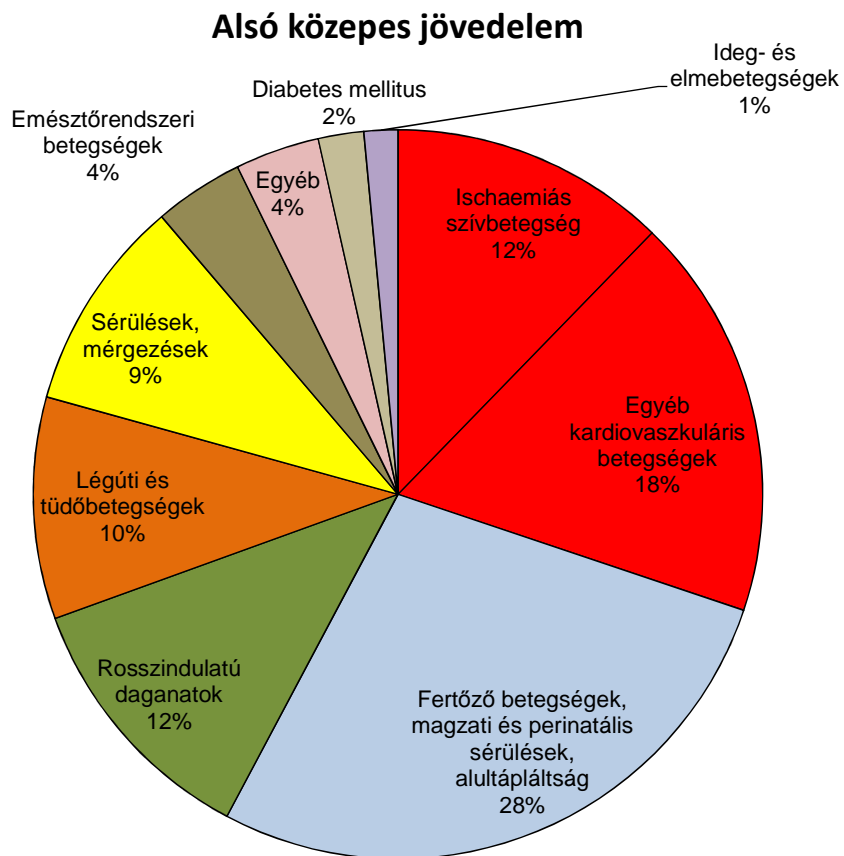
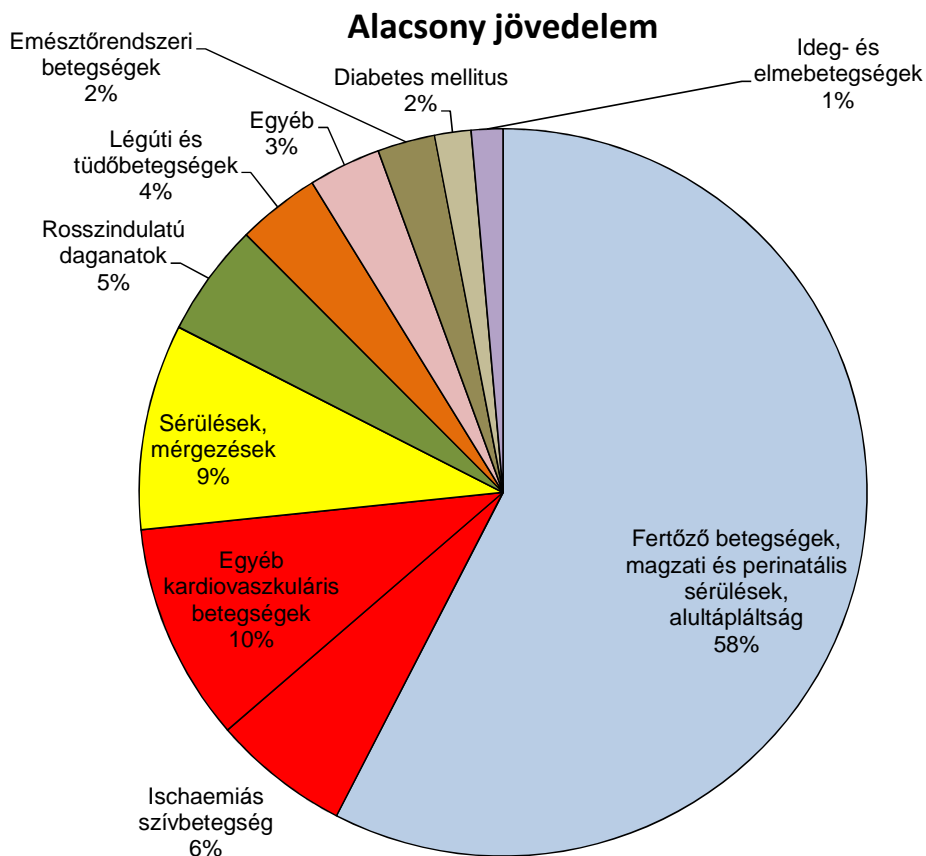
3.8. A receptor rezerv kvantifikálása.....	46
3.9. A CPA koncentráció-hatás görbék NBTI okozta torzulásának kvantifikálása.....	46
3.10. Az NBTI jelenlétében felvett adenosin koncentráció-hatás görbék hatás értékeinek korrekciója.....	47
3.11. Adatelemzés.....	49
<b>4. Eredmények .....</b>	<b>51</b>
4.1. Az A <sub>1</sub> adenosin receptor CPX iránti affinitásának változása 8 napos tiroxin-kezelés után .....	51
4.1.1. A tiroxin-kezelés hatása a tengerimalacok testtömegére .....	51
4.1.2. Az A <sub>1</sub> adenosin receptor affinitás változása adozinnal vizsgálva .....	51
4.1.3. Az A <sub>1</sub> adenosin receptor affinitás változása CPA-val vizsgálva .....	52
4.2. A pitvari direkt negatív inotrópia A <sub>1</sub> adenosin receptor rezervje.....	55
4.2.1. A 3., 4., 5. protokollhoz és a 6. protokoll eredeti hat csoportjához tartozó pitvarok adenosin-érzékenysége.....	55
4.2.2. Az FSCPX viselkedése izolált pitvaron .....	55
4.2.3. Az A <sub>1</sub> adenosin receptor rezerv a szintetikus agonisták direkt negatív inotróp hatására nézve.....	57
4.2.4. Az A <sub>1</sub> adenosin receptor rezerv az adenosin direkt negatív inotróp hatására nézve .....	63
<b>5. Megbeszélés .....</b>	<b>72</b>
5.1. A tengerimalac pitvari A <sub>1</sub> adenosin receptor CPX iránti affinitásának változása 8 napos tiroxin-kezelés után .....	72
5.2. A direkt negatív inotróp hatás A <sub>1</sub> adenosin receptor rezervje tengerimalac pitvaron...	76
5.2.1. A szintetikus A <sub>1</sub> receptor agonisták affinitása receptorukhoz.....	77
5.2.2. Az A <sub>1</sub> receptor rezerv a szintetikus agonisták pitvari direkt negatív inotróp hatására nézve.....	79
5.2.3. A receptor rezerv hatásfüggése .....	80
5.2.4. Az A <sub>1</sub> receptor rezerv az adenosin pitvari direkt negatív inotróp hatására nézve .....	83
5.2.5. A direkt negatív inotróp hatásra vonatkozó nagy A <sub>1</sub> receptor rezerv jelentősége .....	87
<b>6. Az új eredmények összefoglalása .....</b>	<b>90</b>
<b>7. Summary of the findings.....</b>	<b>91</b>
<b>8. Irodalom .....</b>	<b>92</b>
8.1. A disszertáció elkészítéséhez felhasznált irodalom.....	92
8.2. A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények .....	101
<b>9. Tárgyszavak .....</b>	<b>103</b>
<b>10. Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>104</b>
<b>11. Függelék.....</b>	<b>105</b>

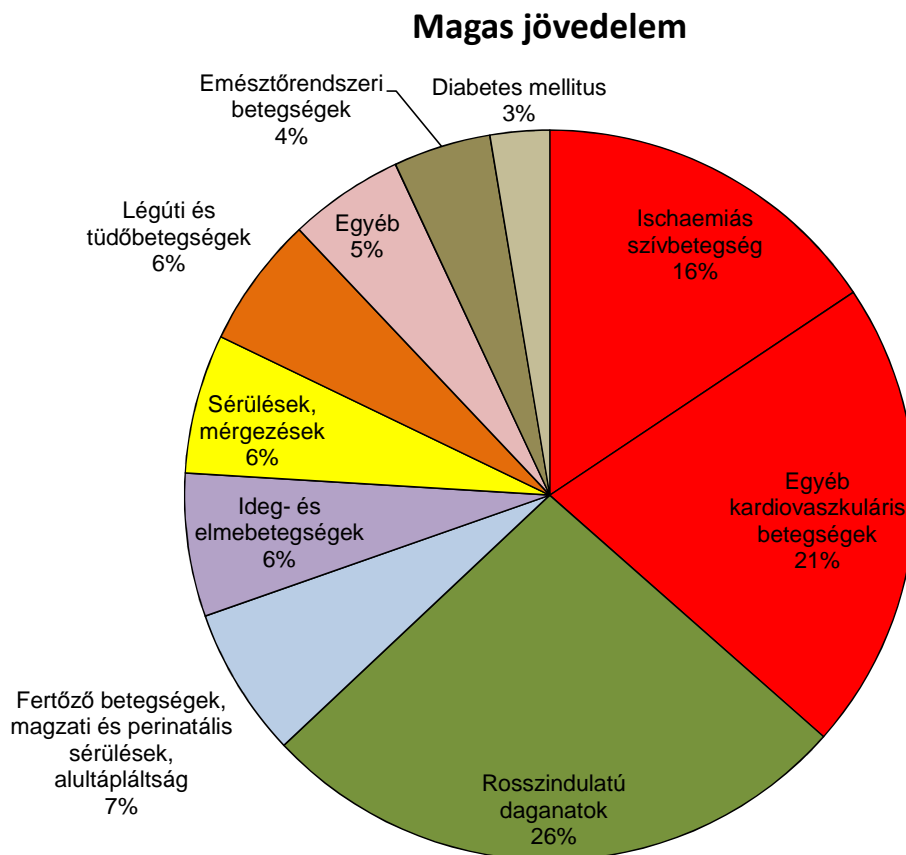
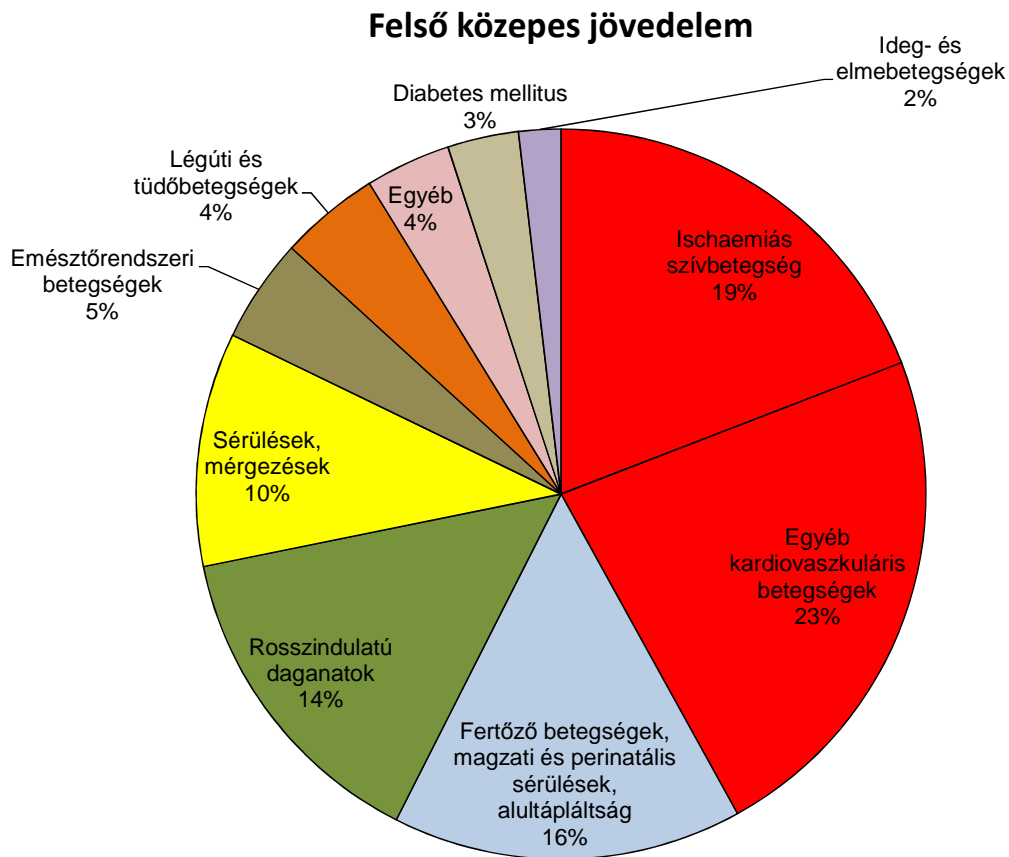
# 1. Bevezetés és célkitűzés

A legalacsonyabb jövedelmű országokban élők számára napjainkban is az alapvető szükségletekben mutatkozó hiány és a fertőző betegségek jelentik a legfőbb kihívást a várható élettartam szempontjából. Ezzel szemben már az alsó közepes jövedelemmel rendelkező országokban is az élre kerülnek a kardiovaszkuláris betegségek mint legjelentősebb haláloki csoport, és ezt a vezető helyet megtartják a felső közepes és a magas jövedelmű országokban is. Ezzel összhangban Magyarországon is a szív- és érrendszeri betegségek jelentik a legnagyobb veszélyt a várható élettartam és az életminőség szempontjából, megelőzve a legkomolyabb riválisnak számító rosszindulatú daganatos betegségeket (1. ábra). A keringési rendszer betegségei többségükben a nagyvérköri artériák atherosclerosisára vezethetők vissza, ami általában érinti a szívét ellátó koszorúsereket is. Ennek következtében az ischaemiás szívbetegség az egyik vezető halálok a jobb életszínvonalon élők számára (1. ábra).

Érdekes fejlemény ugyanakkor, hogy a legfejlettebb országokban a kardiovaszkuláris betegségek (és ezeken belül az ischaemiás szívbetegség) aránya csökkenni kezdett a többi halálokokhoz képest (1. ábra), melyet a széleskörű felvilágosító kampányoknak és ezzel összefüggésben a tért hódító egészségtudatosabb életvitelnek tulajdoníthatunk. (Magyarország sajnos ezen a téren le van maradva a többi magas jövedelmű országhoz képest.) A magas életszínvonal tehát nem jelent szükségszerűen nagy kardiovaszkuláris kockázatot, megfelelő életvitellel sokat lehet tenni a szív és az erek egészségéért.

Az ischaemiás szívbetegség visszaszorításának jól ismert módja az atherosclerosis megelőzése egészségesebb táplálkozással és (a mozgásszegény életet élők számára) több aerob (a dolgoztatott izmok vérellátását nem korlátozó) mozgással. Új lehetőségnek számít ugyanakkor a szív ischaemiával szembeni endogén védekezőképességének fokozása, amely különösen a már kialakult koronária-szklerózisban szenvedők számára fontos. A szív ischaemiával szembeni endogén védekezésében alapvető szerepet tölt be az adozin, amely protektív és reparatív folyamatokat iniciál az ischaemiának kitétt myocardiumban. Ezek farmakológiai befolyásolhatósága világszerte a kutatás élvonalában van.





**1. ábra.** A főbb halálókók aránya 2008-ban a világ országainak életszínvonal szerint bontott 4 csoportjában. Magyarország a magas jövedelmű kategóriában van. A piros szín jelzi a kardiovaszkuláris betegségek okozta elhalálozást (WHO, 2012).



A myocardium nyugalmi adenzin-szintje nem befolyásolja lényegesen a szív működését. Patológias körülmények között (pl. ischaemiában) azonban az interstitialis adenzin koncentráció kellően megemelkedik ahhoz, hogy ingerelje az adenzin receptorokat. A szív adenzinerg mechanizmusai kiemelkedő jelentőségűek a károsodások megelőzésében illetve az elszenvedett sérülések helyrehozatalában (Headrick és mtsai, 2003, 2011; Headrick és Lasley, 2009).

Régről ismert a pajzsmirigy 3,3',5-triiodo-L-tironin ( $T_3$ ) és L-tiroxin ( $T_4$ ) hormonjainak hatása a keringési rendszerre (Dillmann, 2002; Danzi és Klein, 2012) és azon belül is a szív adenzinerg rendszerére (Szentmiklósi és mtsai, 1992; Kaasik és mtsai, 1994; El-Ani és mtsai, 1994; Gesztelyi és mtsai, 2003a, 2003b). Ennek ellenére relatíve kevés és egymásnak ellentmondó adat áll rendelkezésre a myocardium fő adenzin receptor típusának, az  $A_1$  adenzin receptornak a változásáról hyperthyreoid körülmények között. Igaz ez az  $A_1$  adenzin receptor ( $A_1$  receptor) ortoszerikus kötőhelyének esetleges változására is.

Az  $A_1$  receptor sokféle szövettípuson expresszálódik az emlős szervezetben (Fredholm és mtsai, 2001, 2011; Fredholm, 2010). Ez komoly kihívást jelent az  $A_1$  receptor agonista tulajdonságú gyógyszerjelöltek fejlesztése szempontjából, mivel a beadott molekula minden  $A_1$  receptor hordozó szöveten hatni fog, nem csak a terápiás célponton. A probléma megoldásában segítséget jelenthet, hogy a kifejlődő hatás nem egyforma intenzitású a különböző szöveteken. A hatás függ ugyanis a receptorszámtól és a receptor által befolyásolt jelátviteli utaktól, amelyek általában eltérőek a különböző szöveteken. Az  $A_1$  receptor agonista gyógyszerjelöltek mellékhatás-profilja szempontjából tehát nagy jelentősége van annak, hogy az egyes szöveteken a rájuk jellemző adenzinerg hatások milyen intenzíven válthatók ki, vagyis mekkora az ún.  $A_1$  receptor rezervjük (Dhalla és mtsai, 2003; Kenakin, 2009). Tudomásunk szerint az  $A_1$  receptor rezervet a pitvari negatív inotróp hatásra még nem határozták meg, noha a pitvari kontraktilitás gyengülése hátrányosan érinti a kamrai telődést, és ami ennél is fontosabb, pitvari thrombus kialakulására hajlamosít.

A fentiek alapján a jelen értekezést megalapozó vizsgálatainknak két fő célja volt:

1. Fel kívántuk deríteni, hogy a tiroxin-kezelés megváltoztatja-e a pitvari  $A_1$  receptor ortoszerikus kötőhelyének affinitását. E célból megbecsültük a szelektív, kompetitív  $A_1$  receptor antagonistá CPX (8-cyclopentyl-1, 3-dipropylxanthine) affinitását az  $A_1$

receptorhoz. Az első cél megvalósításához szükséges kísérleteket a továbbiakban a disszertáció első vizsgálati modelljének nevezzük.

2. Meg kívántuk határozni, mekkora az  $A_1$  receptor rezerv a pitvari direkt negatív inotróp hatásra nézve. Mivel a receptor rezerv konkrét értéke függ az agonistától is (Dhalla és mtsai, 2003), a vizsgálathoz többféle ligandot használtunk: három stabil szintetikus agonistát, továbbá a bomlékony fiziológias agonistát, az adenzint. A második cél megvalósítása érdekében végzett kísérleteket a továbbiakban a disszertáció második vizsgálati modelljének nevezzük.

Kísérleti rendszerként izolált, ingerelt tengerimalac bal pitvart használtunk. Ez lehetővé tette, hogy az  $A_1$  receptor affinitását és rezervjét zavaró külső hatásoktól mentesen vizsgáljuk. A faj kiválasztásakor abból indultunk ki, hogy a laboratóriumi állatok közül a tengerimalac  $A_1$  receptora áll a legközelebb az emberéhez (Fredholm és mtsai, 2001).

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. Az adenzin és az adenzin receptorok

Az adenzin egy kovalensen kapcsolódó adeninből és ribózból álló nukleozid, amely az élő szervezetben folyamatosan termelődik és eliminálódik. Az adenzin a nukleinsav anyagcsere kiemelt jelentőségű molekulája, mivel metabolit szerepén túl az adenzin receptorok családjának endogén agonistája. Ez a többi nukleozidhoz (guanozin, uridin, timidin, citidin) képest kitüntetett szerep annak köszönhető, hogy az adenzin a szervezet energiaforgalmában központi szerepet betöltő ATP (adenzin-5'-trifoszfát) prekuzora és egyben bomlásterméke, így a többi nukleozidnál érzékenyebb jelzője a szervezet energetikai státuszának. A szöveti adenzin koncentrációjának megnövekedése a sejtek kimerülésére utal.

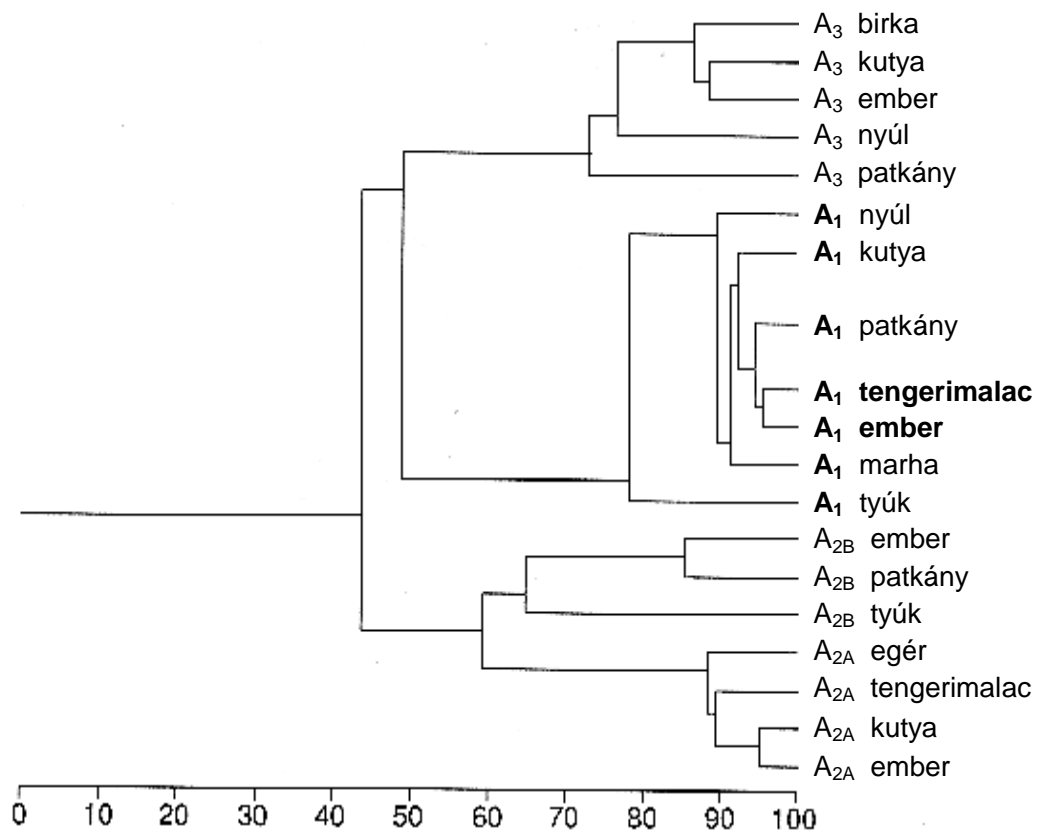
A sejteken belül az adenzin főleg AMP-ből keletkezik, nagyrészt az endo-5'-nukleotidáz, kisebb részben alkalikus foszfatázok révén. Az S-adenozil-homocisztein-hidroláz (SAH-hidroláz) is hasít le adenzint S-adenozil-homociszteinből (SAH), ami intracelluláris adenzin-raktárként működik. Az extracelluláris térben az adenzin a sejtekből kijutott ATP, ADP, AMP és cAMP enzimátikus bomlása révén keletkezik, melynek sebesség-meghatározó lépése az AMP - adenzin átalakulás. Ezt a reakciót ekto-nukleotidázok, elsősorban az ekto-5'-nukleotidáz és az ekto-apiráz katalizálják (Sommerschild és Kirkebøen, 2000, 2002; Fredholm és mtsai, 2001, 2011).

Megfelelő energia-ellátottság mellett a sejtek adenzin tartalmának zöme az adenzin-kináz révén AMP-vé alakul (majd ATP lesz belőle), kisebb része az intracelluláris adenzin-dezamináz által dezaminálódik. Az interstitialis folyadékból az adenzin három mechanizmus révén távozhat: elbontja az extracelluláris adenzin-dezamináz, belép a vérbe, vagy felveszik az adott szövet sejtjei (Sommerschild és Kirkebøen, 2000, 2002; Fredholm és mtsai, 2001). Az adenzin aktív és passzív transzporttal is átléphet a sejtek membránján: előbbi koncentratív (CNT), utóbbi ekvibratív (ENT) nukleozid transzporterek végzik. A szívben elsősorban ENT található, azon belül is ENT1, melynek szelektív gátlója az NBTI (nitrobenzylthioinosine) (Conant és Jarvis, 1991, 1994). Következésképpen a cardiomyocyták nukleozid transzportját döntően az extra- és

intracelluláris adenzin koncentráció különbsége határozza meg (Deussen és mtsai, 1999; Deussen, 2000a, 2000b).

Mivel az adenzin ubikviter expressziójú és jelentős aktivitású enzimek, transzporterek szubsztrátja, az adenzin féléletideje igen rövid (0.6 – 10 s) az emlős szövetekben (Wilbur és Marchlinski, 1997; Pavan és IJzerman, 1998).

Az adenzin nemcsak mint a nukleinsav-anyagcsere metabolitja befolyásolja a sejtek működését, hanem mint egy receptorcsalád endogén agonistája is. Az adenzin receptoroknak három típusa van: az  $A_1$ ,  $A_2$  (ezen belül  $A_{2A}$  és  $A_{2B}$ ), valamint az  $A_3$  (2. ábra).



**2. ábra.** Az adenzin receptorok dendrogrammja néhány laboratóriumi illetve háziállat és az ember esetében. Az alsó skála az aminosav-szekvencia százalékos egyezését mutatja. Látható az emberi és a tengerimalac  $A_1$  adenzin receptor nagyfokú (mintegy 95%-os) homológiája (Fredholm és mtsai, 2001; IJzerman és mtsai, 2012).

Az adenzin receptorok hét transzmembrán doménal rendelkező, G protein-kapcsolt receptorok, melyek kötőhelye az interstitium felé néz. Az  $A_1$  és az  $A_3$  típus

elsősorban gátló ( $G_i$ ), míg az  $A_2$  serkentő G proteinhez ( $G_s$ ) kapcsolódik. Az  $A_1$  típus kapcsolódhat  $G_0$  proteinhez, az  $A_{2B}$  és  $A_3$  pedig  $G_q$  proteinhez is. A hasonló működésű  $A_1$  és  $A_3$ , illetve  $A_{2A}$  és  $A_{2B}$  receptorok között érdekes különbség, hogy az  $A_1$  legalább egy, az  $A_{2A}$  pedig több nagyságrenddel nagyobb affinitású az adenzinnal szemben, mint az  $A_3$  illetve  $A_{2B}$  (Fredholm és mtsai, 2001, 2011; Burnstock és mtsai, 2010; IJerman és mtsai, 2012).

## 2.2. A purinerg transzmisszió felfedezése

A purinok felfedezését 1776-ra datálhatjuk, amikor Carl Wilhelm Scheele húgysavat vont ki hólyagkövekből. A XIX. században számos purin (pl. guanin, adenin, xantin) és pirimidin (timin, citozin, uracil) került felfedezésre, főleg Albrecht Kossel munkássága révén. Emil Fischer ismerte fel a koffein és rokon vegyületei kémiai szerkezetét, a vegyületcsalád „purinok” megjelölése is tőle származik (Fischer, 1907; Burnstock és mtsai, 2010).

Az adenint 1914-ben mutatta ki a vérben Robert Bass, valószínűleg adenzin-5'-monofoszfát (AMP) formában. 1927-ben Gustav Embden és Margarete Zimmermann AMP-t talált a vázizomban. Az adenzin-5'-trifoszfátot (ATP) 1929-ben egymástól függetlenül fedezte fel Karl Lohmann valamint Cyrus Hartwell Fiske és Yellagapada SubbaRow (Burnstock és mtsai, 2010). A purinok biológiai hatásait elsőként Alan Drury és Szent-Györgyi Albert dokumentálta. Eredetileg azt tapasztalták, hogy a szarvasmarha illetve juh szívizom nyers kivonata erőteljes, de átmeneti bradycardiát okoz a legkülönbözőbb állatfajokban, ezen kívül tágítja a koszorúereket és csökkenti az enterális simaizmok aktivitását. Később kimutatták, hogy a hatásért felelős anyag az AMP, továbbá hogy az AMP alkotóeleme, az adenzin, ugyanolyan módon befolyásolja az érintett szervek működését. Felismerték azt is, hogy az adenzin képes megszüntetni a supraventricularis tachyarrhythmiát (Drury és Szent-Györgyi, 1929).

A purinok receptorainak felfedezése szorosan kapcsolódik a purin-származékok idegrendszerre kifejtett hatásának vizsgálatához. Már a XIX. században gyanították, hogy a vegetatív idegek nem csak acetilkolint és noradrenalint üríthetnek működésük során. A 70-

es években azonosították az ATP-t mint neurotranszmittert egyes vegetatív idegvégződésekben, ami felvetette rá specifikus receptorok létezését. Ezt a feltevést Geoffrey Burnstock igazolta, a purinerg receptor (röviden purinoceptor) elnevezés is tőle származik (Burnstock, 1972, 1976).

A purinoceptorokat először egy receptorcsaládnak tekintették. Hamar kiderült azonban, hogy egy részüket az ATP bomlásterméke, az adenzin izgatja ( $P_1$  típus), míg másokat a nukleozid foszfátok ( $P_2$  típus) (Burnstock, 1978). A  $P_1$  purinoceptorokat később a család rangjára emelték adenzin receptorok néven, alkalmazván azt az elvet, hogy a receptorok névadója a legaffinisabb illetve a legnagyobb választ kiváltó endogén agonista legyen. A Nemzetközi Farmakológiai Társaság (IUPHAR) jelenleg négy adenzin receptor (al)típust tart nyilván, ezek az előző alfejezetben már említett  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  és  $A_3$  (Alexander és mtsai, 2011a; IJerman és mtsai, 2012). Korábban leírtak egy ötödik formát, a farmakológiai módszerekkel karakterizált  $A_4$  típust (Cornfield és mtsai, 1992), de ezt nem sikerült klónozással megerősíteni.

A  $P_2$  családot először öt típusba sorolták ( $P_{2X}$ ,  $P_{2Y}$ ,  $P_{2Z}$ ,  $P_{2U}$  és  $P_{2T}$ ), majd ezeket újraosztották két csoportba és a család rangjára emelték:  $P_{2Y}$  (az egykori  $P_{2Y}$ ,  $P_{2U}$  és  $P_{2T}$ ) valamint  $P_{2X}$  (az egykori  $P_{2X}$  és  $P_{2Z}$ ) (Abbraccio és Burnstock, 1994). A G protein-kapcsolt  $P_{2Y}$  család endogén agonistái az ATP, ADP, UTP és UDP. Az ide tartozó receptorok közül még nem sikerült mindet klónozással pontosan azonosítani, ráadásul az egyes altípusokra jellemző receptor proteinek kombinálódhatnak egymással. Emiatt az altípusok száma, sőt még a relatíve jól feltérképezett altípusok ( $P_{2Y_1}$ ,  $P_{2Y_2}$ ,  $P_{2Y_4}$ ,  $P_{2Y_6}$ ,  $P_{2Y_{11}}$ ,  $P_{2Y_{12}}$ ,  $P_{2Y_{13}}$  és  $P_{2Y_{14}}$ ) elnevezése is változhat a jövőben (Burnstock és mtsai, 2010; Alexander és mtsai, 2011a). Az ionotróp  $P_{2X}$  család endogén agonistája az ATP. Hét altípusát különböztetik meg ( $P_{2X_1}$ ,  $P_{2X_2}$ ,  $P_{2X_3}$ ,  $P_{2X_4}$ ,  $P_{2X_5}$ ,  $P_{2X_6}$  és  $P_{2X_7}$ ), de ezek proteinjei is kombinálódhatnak egymással (Alexander és mtsai, 2011b).

A purinerg transzmisszió az egyik legősibb és legelterjedtebb intercelluláris jelzőrendszer az élő szövetekben. Ezen belül az adenzin receptorok részt vesznek csaknem minden szövet biológiai funkcióinak szabályozásában. Az adenzin receptor aktiváció a legtöbb helyzetben jótékony hatású, javítja az egyensúlyt az érintett szövet energiaellátása és energiafelhasználása között, mérsékli a stresszorok okozta károsodást, valamint gátolja a kedvezőtlen szöveti remodellinget. Az adenzin receptorok tehát nagy lehetőségeket rejtő terápiás célterületet jelentenek. Az adenzinerg terápiás próbálkozások kardiovaszkuláris területen már sikeresnek mondhatók, az új indikációs lehetőségek vizsgálata jelenleg is

folyik, biztató eredményekkel (Elzein és Zablocki, 2008; Manjunath és Sakhare, 2009; Schenone és mtsai, 2010; Burnstock és mtsai, 2010; Müller és Jacobson, 2011; Szentmiklósi és mtsai, 2011a; Headrick és mtsai, 2011; Albrecht-Küpper és mtsai, 2012).

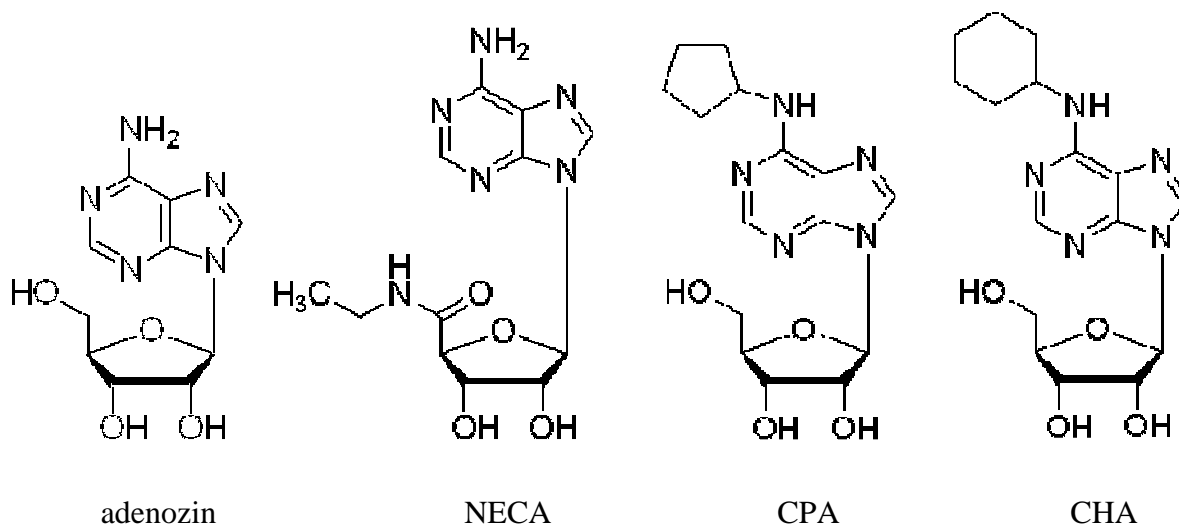
### 2.3. A<sub>1</sub> adenzin receptor agonisták, antagonisták és modulátorok

A receptorok működését specifikus kapcsolódás révén befolyásoló anyagok a kötődés helye alapján kétféleképpen lehetnek: az egyik a receptor azon doménjéhez kötődik, ahová az endogén ligand is (ortoszterikus szerek), a másik valamely ezen kívüli helyhez (allosztérikus szerek). Az ortoszterikus molekulák lehetnek agonisták vagy antagonisták, az allosztérikusak esetében inkább pozitív modulátorokról (aktivátor, enhancer) illetve negatív modulátorokról beszélünk. Ez a nomenklatura nem merev, a IUPHAR jelenleg érvényben levő ajánlása megengedi az allosztérikus agonista illetve allosztérikus antagonisták terminust a pozitív illetve negatív modulátor szinonimájaként (Neubig és mtsai, 2003). Ettől függetlenül a továbbiakban az agonista és az antagonisták kifejezést szűk értelemben használjuk (csak ortoszterikus ligandokra).

Az A<sub>1</sub> adenzin receptor (A<sub>1</sub> receptor) agonisták terápiai alkalmazásának fő célja, hogy valamely szöveten elindítsák azokat az endogén protektív illetve regeneratív folyamatokat, amelyeket egyébként a fiziológiai agonista, az adenzin vált ki (Szentmiklósi és mtsai, 2011a). A<sub>1</sub> receptor agonisták jelenleg három fő terápiai céllal állnak fejlesztés illetve kipróbálás alatt: antiarrhythmias illetve antianginás szerekként, antilipolitikus (ezáltal antidiabetikus) szerekként, valamint neuropátiás fájdalom elleni antinociceptív hatóanyagként (Elzein és Zablocki, 2008; Schenone és mtsai, 2010; Szentmiklósi és mtsai, 2011a).

A szintetikus A<sub>1</sub> receptor agonisták között az adenzinnál stabilabb vegyületek is vannak, amelyek jobban ellenállnak az adenzin metabolizmusában szereplő enzimeknek, mint az adenzin (Pavan és IJzerman, 1998; Fredholm és mtsai, 2001, 2011). A kevésbé bomlékony szintetikus A<sub>1</sub> receptor agonisták közös jellemzője, hogy koncentráció-hatás (E/c) görbéik balra helyezkednek el az adenzin azonos körülmények között felvett E/c görbéitől (Gesztelyi és mtsai, 2003b). A kevésbé bomlékony agonisták E/c görbéiből

megbízhatóbb adatokat lehet kinyerni az A<sub>1</sub> receptor működéséről, mert kevésbé függenek az érintett enzimek (és transzporterek) aktivitásától. Kísérleteinkben ezért az adenzinon kívül három relatíve stabil, szintetikus A<sub>1</sub> receptor agonista is helyet kapott: a NECA (5'-(N-ethylcarboxamido)adenosine), a CPA (N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine) és a CHA (N<sup>6</sup>-cyclohexyladenosine) (3. ábra).



**3. ábra.** Az adenzin, NECA, CPA és CHA szerkezete (A<sub>1</sub> receptor full agonisták).

A NECA 5'-módosított ribóz gyűrűvel rendelkező adenzin analóg, amely A<sub>1</sub> és A<sub>2</sub> receptor full agonista. Ligandkötési assay-vel meghatározott K<sub>i</sub> értékei patkány illetve emberi A<sub>1</sub> és A<sub>2</sub> receptorok esetében egyaránt a 10 nM-os nagyságrendben vannak (a K<sub>i</sub> a K<sub>A</sub>-val azonos jelentésű, csak más módszerrel meghatározott állandó, ld. 9. egyenlet) (Fredholm és mtsai, 2001). A vérmentes myocardiumban relatíve stabil vegyület (a munkacsoport tapasztalata). Egyes terápiás céllal fejlesztett A<sub>1</sub> receptor agonistákban szintén 5'-módosított ribóz gyűrű van (Elzein és Zablocki, 2008).

A CPA ciklopentil szubsztituált purinvázú adenzin analóg, amely szelektív A<sub>1</sub> receptor full agonista. K<sub>i</sub> értékei patkány és humán A<sub>1</sub> receptor esetén 0,1 és 1 nM-os nagyságrendűek (Fredholm és mtsai, 2001). Az adenzinnál lassabban eliminálódik vért tartalmazó szövetekből is (Pavan és IJerman, 1998), vértelen pitvaron pedig kimondottan stabil (Gesztelyi és mtsai, 2004). A kardiológiai céllal fejlesztett A<sub>1</sub> receptor agonisták szerkezetileg rendszerint a CPA-ból indulnak ki (Elzein és Zablocki, 2008).

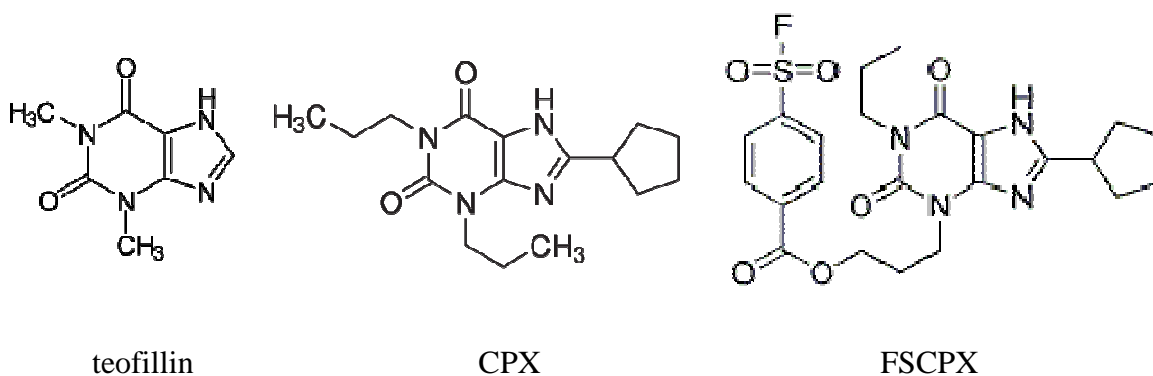
A CHA ciklohexil szubsztituált purinvázú, szelektív A<sub>1</sub> receptor full agonista. K<sub>i</sub> értéke a CPA-éhoz hasonló (Fredholm és mtsai, 2001). Jellegzetessége, hogy a CPA-nál is



stabilabb, alig bomlik (Pavan és IJerman, 1998). Van olyan terápiás céllal fejlesztett  $A_1$  receptor agonista, amely a CHA-ból indul ki (Elzein és Zablocki, 2008).

Az  $A_1$  és  $A_2$  receptorok közismert kompetitív antagonistái a metil-xantin vegyületek, elsősorban a koffein és a teofillin. Ezeket – empirikus alapon – régóta használják mint fáradtságűző, teljesítményfokozó (koffein) illetve hörgőtágító (teofillin) szereket. Emellett mindkettő pozitív tróp hatásokat fejt ki a szívre, de ezt terápiásan általában nem hasznosítják (mint mellékhatás jelentkezik). Kísérleti szempontból a metil-xantinok legfőbb hátránya, hogy más támadáspontjaik is vannak, foszfodiészteráz gátlók és ryanodin receptor agonisták is egyben (Szentmiklósi és mtsai, 2011b).

A jelen értekezést megalapozó vizsgálatokhoz használt antagonisták a CPX (DPCPX; 8-cyclopentyl-1, 3-dipropylxanthine) és az FSCPX (8-cyclopentyl-3-[3-[[4-(fluorosulfonyl)benzoyl]oxy]propyl]-1-propylxanthine). Mindketten a teofillinhez hasonló szerkezetűek, de szelektívek az  $A_1$  receptorra (4. ábra). A CPX kötődése az  $A_1$  receptorhoz reverzibilis és így azt kompetitív módon antagonizálja (Fredholm és mtsai, 2001). Az FSCPX először szintén reverzibilisen kötődik az  $A_1$  receptorhoz, ezt azonban egy időigényes, feltehetően kovalens kapcsolódási lépés követi, amely az FSCPX-et irreverzibilis antagonistává teszi (Srinivas és mtsai, 1996; Morey és mtsai, 1998).

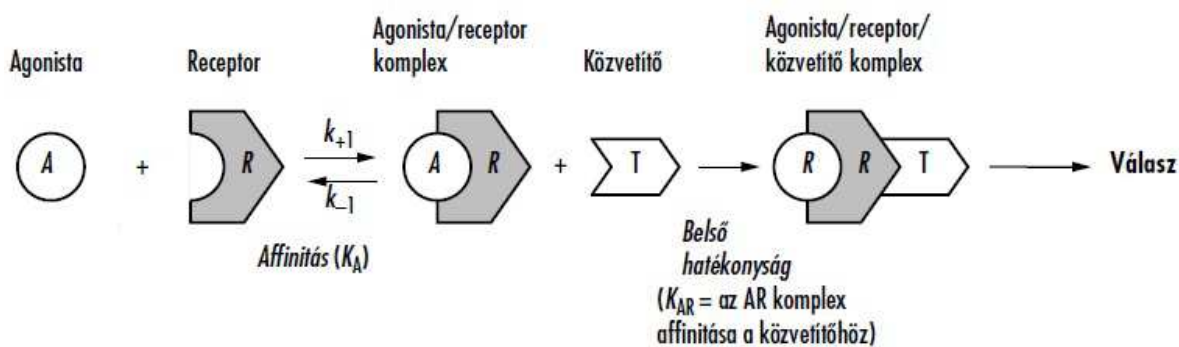


**4. ábra.** A teofillin, CPX és FSCPX szerkezete ( $A_1$  receptor antagonisták).

Az allosztérikus modulátorok ígéretes sajátossága, hogy velük a receptorok működése tág keretek között befolyásolható, vagyis egy agonista E/c görbéje elvileg szinte minden paraméterében a kívánalmaknak megfelelően módosítható (Gao és mtsai, 2005). Az  $A_1$  receptorhoz is többféle modulátort fejlesztettek ki, elsősorban enhancer-eket (Elzein és Zablocki, 2008), ezek azonban kívül esnek a jelen értekezés érdeklődési körén.

## 2.4. A receptor rezerv

A receptoriális jelátvitel kiindulópontja az agonista-receptor komplex kialakulása. A komplex stabilitásának jellemző paramétere az affinitás, amely meghatározza az agonista receptorhoz való kötődését (receptor okkupancia). Míg receptorhoz való affinitása az antagonistáknak is van, az agonista egy további, az antagonistára nem jellemző tulajdonsággal is rendelkezik. Az agonista-receptor komplex olyan folyamatokat indít el, amelyek megváltoztatják a receptort hordozó sejt működését. Az agonistának ezt a hatásgeneráló képességét jellemzi az ún. belső (intrinzik) hatékonyság. A legegyszerűbb esetben az agonistát kötött receptor konformációváltozása önmagában hatáshoz vezet (pl. ioncsatorna receptor kinyílása), legtöbbször azonban az aktivált receptor valamilyen közvetítőhöz (pl. G protein) kapcsolódik és ez indítja el a hatáshoz vezető további folyamatokat (5. ábra).



**5. ábra.** Az agonista-receptor kölcsönhatás és a jelátvitel sémája (Neal, 2000)

Amennyiben az agonista koncentrációját bemenő, míg a hatás nagyságát kimenő jelnek tekintjük, értelmezni tudjuk a receptor (és a hatás kialakulásához az esetek többségében szükséges további struktúrák, az ún. posztreceptorális szignalizáció) jelerősítő képességét. A hagyományos receptorelmélet fogalmi keretein belül a jelerősítő képességet az ún. receptor rezerv jellemzi (Dhalla és mtsai, 2003; Kenakin, 2009).

Egy adott szövet részéről egy adott agonistára adott válasz tehát sok tényezőtől függ. Bár kölcsönhatásról van szó, tehát az agonista és a receptor koncentrációit kivéve minden más paramétert az agonista és a receptor (plusz posztreceptorális szignalizáció) közösen határoznak meg, szokás agonistafüggő és rendszerfüggő jellemzőkről beszélni.

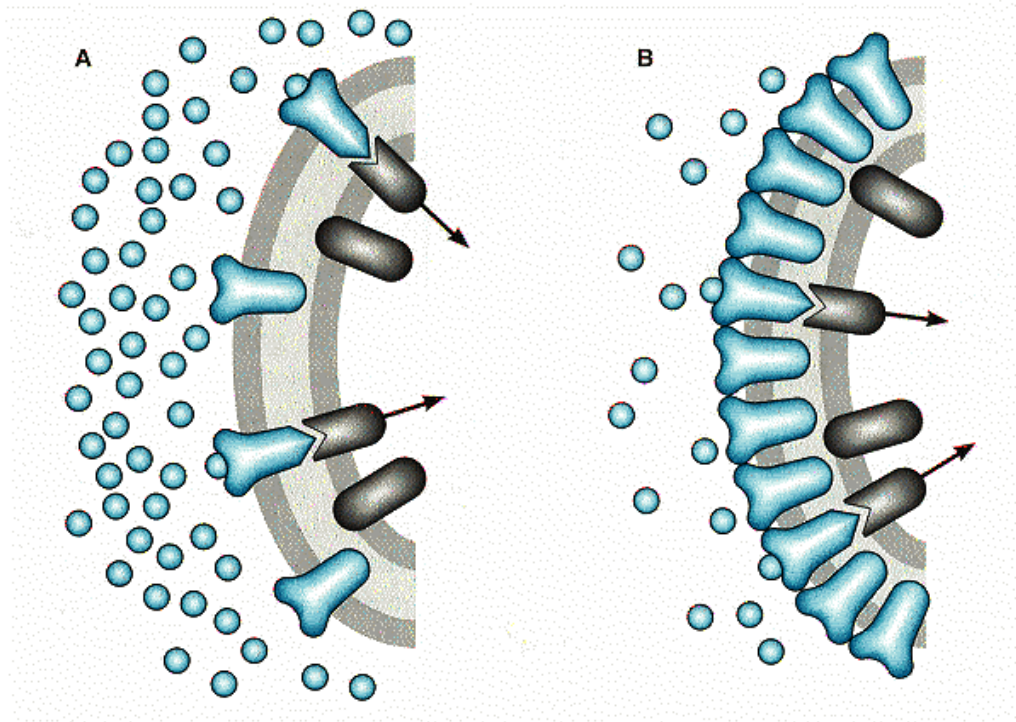
Agonistafüggőnek tekintett tényezők az agonista koncentráció, az agonista receptorhoz való affinitása és az intrinzik hatékonyság, míg rendszerfüggőnek veszik a receptorszámot és a receptor rezervet (Kenakin, 2009).

A receptor rezerv fogalmának bevezetése szakítást jelentett a korai receptor modellek azon feltételezésével, hogy a maximális receptoriális válasz eléréséhez minden receptornak agonistát kell kötnie (vagyis 100%-os receptor okkupációra van szükség). Erre azért került sor, mert számos szöveten tapasztalták, hogy a receptorok egy részének irreverzibilis antagonistával való kiiktatása ellenére egyes agonistákkal gyakorlatilag ugyanakkora maximális hatás váltható ki, mint a teljes receptorkészletű szöveten. (Ezt egyébként csak full agonisták esetén tapasztalták.) A jelenséget „tartalék receptorok” (spare receptors), azaz receptor rezerv (receptor reserve) jelenlétével magyarázták az adott szöveten (Ruffolo, 1982; Kenakin, 1987, 2009). A hagyományos receptorelmélet fejlődése során a receptor rezerv fogalma elvesztette ezt a konkrét értelmezését és a jelerősítő funkció absztrakt jellemzőjévé vált (6. ábra). A modern alternatív receptor modellek nem használják a receptor rezerv fogalmát, másképp közelítik meg a jelerősítés kérdését (Leff, 1995; Bindslev, 2008).

Mint a receptor (és a posztreceptorális szignalizáció) jelerősítésének jellemzője, a receptor rezerv függ a jelátvitel minden szereplőjének mennyiségétől és minőségétől, kivéve természetesen az agonista koncentrációját és affinitását (ld.: 5. ábra). A receptor rezerv egyik determinánsa a szövet jellege, vagyis a posztreceptorális jelátvitel molekuláris elemeinek típusa és koncentrációja. A receptor rezerv másik fontos meghatározója a mért hatás, mivel ugyanazon szövet ugyanazon receptora esetén is általában eltérnek egymástól a különböző hatásokhoz tartozó posztreceptorális jelátviteli utak. Bár az intrinzik hatékonyságot agonistafüggő paraméternek tekintik, a receptor rezerv bizonyítottan függ ettől is (Brown és Goldstein, 1986; Srinivas és mtsai, 1997; Kenakin, 2009). Noha a receptorszámot általában külön kezelik, a receptor rezerv nem lehet független a receptorok koncentrációjától sem, hiszen minél több a receptor, annál több agonista/receptor/közvetítő komplex alakulhat ki, és ezáltal egy adott hatás annál kisebb agonista koncentrációnál jelentkezhet (egyéb feltételek teljesülése esetén a kiváltható maximális hatás is nőhet) (ld.: 6. ábra).

A receptor rezerv lényegében hatás „előreszaladását” jelenti a hozzá tartozó receptor okkupációhoz képest. Ennek megfelelően legegyszerűbb mutatója a PSR (pharmacological shift ratio), ami a félmaximális receptor okkupációt létrehozó agonista koncentráció ( $K_A$ ,

ld.: 9. egyenlet) és a félmáximális hatáshoz szükséges agonista koncentráció ( $EC_{50}$ , ld.: 3. egyenlet) hányadosa ( $PSR = K_A/EC_{50}$ ). Ez alapján receptor rezervról beszélhetünk, ha a félmáximális hatáshoz nem szükséges a receptorok felének elfoglalása ( $PSR > 1$ ). A PSR tehát a receptor rezervet egyetlen értékkel jellemzi (Ruffolo, 1982).



**6. ábra.** A receptor rezerv korai értelmezése szerint az agonistát kötő receptorok extra mennyisége áll annak háttérében, hogy egyes esetekben (gyakorlatilag) maximális hatás jelentkezik már szubmaximális receptor okkupancia mellett. A „tartalék receptorok” jelenléte magyarázatot kínál arra a jelenségre is, hogy miért szükséges nagyobb agonista koncentráció ugyanakkora hatás kiváltásához az egyik szöveten, mint a másikon, azonos affinitású receptorok mellett. Az **A** és a **B** panelen ábrázolt rendszerekben egyenlő nagyságú válaszok generálódtak (fekete nyilak) az eltérő agonista koncentrációk ellenére (Katzung, 2001). Belátható, hogy ha csak a közvetítők (sötétszürke, szabad állapotban ovális struktúrák a sejtmembrán belső felszínén) számát növelnénk meg, az is csökkentené az adott hatás eléréséhez szükséges agonista koncentrációt, mivel az is növelné az esélyét az agonista/receptor/közvetítő komplex létrejöttének. Ez lehetőséget ad arra, hogy a receptor rezerv értelmezése elszakadjon a receptorszámtól, és a jelátvitel egészét jellemezze.

A receptor rezerv árnyaltabb mutatója a százalékos receptor rezerv ( $RR\%$ ), amely a százalékos hatás ( $E\%$ ) és a százalékos receptor okkupancia ( $\rho\%$ ) különbsége (ld.: 20).

egyenlet). A  $E_{\%}$  a maximális hatás százalékában kifejezett hatás (17. egyenlet), a  $\rho_{\%}$  pedig az összes receptor koncentrációjának százalékában kifejezett agonista-receptor komplex koncentráció (ld.: 18. egyenlet)·100%) (Kenakin, 1987). Noha minden  $E_{\%}$  értékhez külön  $RR_{\%}$  érték tartozik, a szakirodalomban fellelhető  $RR_{\%}$  értékeket csak néhány önkényes  $E_{\%}$ -hoz határozták meg, általában 50%-hoz és/vagy 100%-hoz.

Receptor rezerv csak full agonista esetén detektálható. Egy full agonista receptor rezervje egyetlen E/c görbe alapján nem határozható meg, szükség van kiegészítő adatokra. Erre kísérletesen két lehetőség kínálkozik:

1. A gyakoribb módszer szerint az első E/c görbe felvétele után irreverzibilis antagonistával inaktíválják a receptorok egy részét, majd a depletált receptorkészletű rendszerben is felveszik a E/c görbét ugyanazzal az agonistával (Motulsky és Christopoulos, 2004).

2. A ritkábban alkalmazott módszer során irreverzibilis agonistát használnak a E/c görbe felvételéhez, azután ligandkötési assay-vel meghatározzák az irreverzibilisen módosult receptorok hányadát (Zhang és mtsai, 1997).

Amennyiben a receptor rezerv kicsi (egy adott szövet adott receptora esetében valamely agonistára és hatásra nézve), egy agonista csak akkor vált ki számottevő hatást, ha nagy hatáskiváltó képességű (erős) és/vagy nagy koncentrációban van jelen. Ennek megfelelően, ha a receptor rezerv nagy, az erős agonista már kis koncentrációban hatékony lesz, a gyenge pedig, igaz csak nagy koncentrációban, de hatni fog (Dhalla és mtsai, 2003).

Nagyobb rezerv mellett tehát ugyanaz az agonista nagyobb hatásereőségű (kisebb koncentráció szükséges ugyanahhoz a hatáshoz). Ha tehát a szervezet több szövete is hordozza ugyanazt a receptort, de azokon a receptorszám és a jelerősítő képesség (vagyis a receptor rezerv) különböző, akkor egy adott agonista adott koncentrációja a különböző szöveteken különböző  $E_{\%}$ -ot fog elérni (eltérő százalékát fogja kiváltani az egyes szövetekre jellemző valamely hatás maximumának) (Dhalla és mtsai, 2003).

## 2.5. Az $A_1$ adenzin receptor rezerv jelentősége

A csaknem minden emlős szövetben expresszáldó  $A_1$  receptorok számos összetett fiziológiai és patofiziológiai szabályozó folyamatot indítanak el illetve befolyásolnak

(Fredholm és mtsai, 2001, 2011; Fredholm, 2010). Ez, amellet, hogy nagy lehetőségeket rejt magában, komoly kihívást is jelent az A<sub>1</sub> receptorokat megcélzó gyógyszerkutatók számára. Mivel egy szisztémásan beadott A<sub>1</sub> receptorra ható szer elvben a szervezet minden A<sub>1</sub> receptorának működését módosítja, nehézségbe ütközhet az indikációnak megfelelő szövetspecifitása biztosítása (Dhalla és mtsai, 2003).

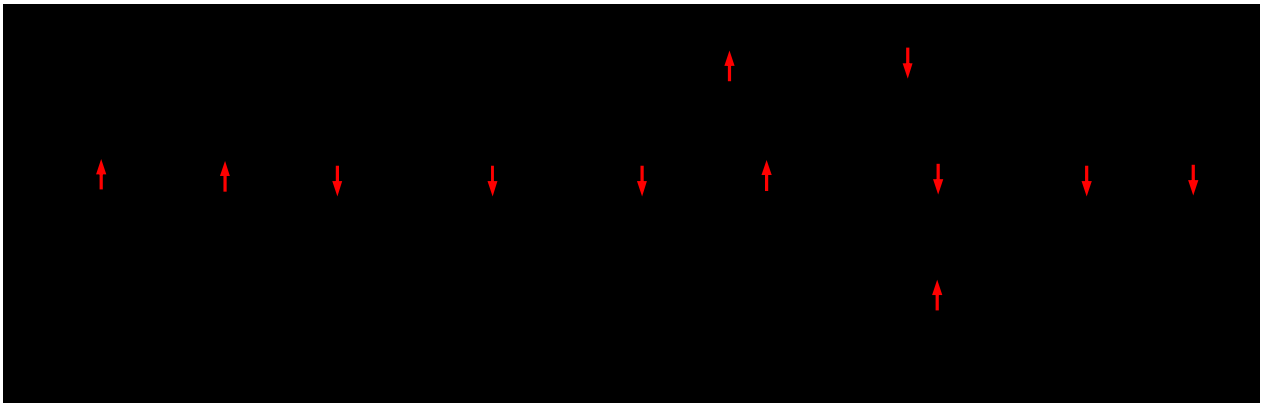
A megfelelő szövetspecifitása elérése érdekében kihasználhatjuk, hogy a különböző szövetek A<sub>1</sub> receptorai eltérő válaszkészséget mutatnak. A szöveti válaszkészség fő meghatározói a receptorfunkció két rendszerfüggő paramétere, a receptorszám és a receptor rezerv. E két paraméter általában párhuzamosan változik (ami nem meglepő annak ismeretében, hogy a receptor rezerv függ a receptorok mennyiségétől), így az A<sub>1</sub> receptorok koncentrációja és rezervje is szoros pozitív korrelációt mutat a különböző szöveteken (Dhalla és mtsai, 2003).

A zsírszövethez és az idegszövethez képest a szív kis A<sub>1</sub> receptor rezervvel rendelkezik az általa mediált elektrofiziológiai hatásokra nézve (ld. lentebb) (Dhalla és mtsai, 2003). A nem kardiológiai indikációjú (pl. antidiabetikus, antinociceptív) adenozerinerg gyógyszerek fejlesztése szempontjából ez megnyugtató, hiszen csökkenti ezek kardiális mellékhatásainak kockázatát. A receptor rezerv hatásfüggése (Brown és Goldstein, 1986; Srinivas és mtsai, 1997) miatt azonban az A<sub>1</sub> receptor rezervet minden fontosabb hatásra érdemes megvizsgálni. Legjobb tudásunk szerint a myocardialis A<sub>1</sub> receptor rezervet még nem határozták meg a pitvari negatív inotróp hatásra, noha ez lényeges nemkívánatos hatása lehet az A<sub>1</sub> receptor agonistáknak.

## 2.6. A pitvari A<sub>1</sub> adenozerin receptor negatív inotróp hatása

A pitvarokon az A<sub>1</sub> receptor mediálta negatív inotrópia két fő szignalizációs utat foglal magába: a G protein-kapcsolt befelé egyenirányító K<sup>+</sup> (GIRK) csatornák (közelebbről: muszkarin aktivált K<sup>+</sup> csatornák) nyitását és az adenilcikláz gátlását (7. ábra). A döntően supraventricularis szöveten található GIRK csatornák a cardiomyocytá sejtmembrán hiperpolarizálásával rövidítik az akciós potenciált, így csökkentik a platófázis során beáramló Ca<sup>2+</sup> mennyiségét (Kurachi és mtsai, 1986; Belardinelli és mtsai, 1995). Az

adenilcikláz gátlása a cAMP-függő protein kináz A aktivitásának csökkenéséhez vezet. A visszaszorult protein kináz A általi foszforiláció fokozza a foszfolambán aktivitását, csökkenti az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  áramot és ezek mellett foszfoprotein foszfatázokat aktivál (Gupta és mtsai, 1993; Neumann és mtsai, 1995). Mivel a defoszforilált foszfolambán hatékonyabban gátolja a szarkoplazmatikus retikulum (SER)  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-ázát (SERCA), csökken a  $\text{Ca}^{2+}$  visszavétele a SER-be, ami a sejt  $\text{Ca}^{2+}$  vesztéséhez vezet. A SER kisebb  $\text{Ca}^{2+}$  tartalma és az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  áram visszaszorulása egyaránt oda hat, hogy csökken az akciós potenciál platófázisa során a citoszólba jutó szabad  $\text{Ca}^{2+}$  (ehhez hozzáadódik a GIRK csatorna nyitás ugyanilyen irányú hatása is), ami erőteljesen csökkenti a pitvari kontrakciós erőt (Belardinelli és mtsai, 1995).



**7. ábra.** Egy tipikus szintetikus  $\text{A}_1$  receptor agonista (stabil és szelektív), valamint a gyorsan metabolizálódó adenzin negatív inotróp hatásának mediációja tengerimalac pitvari munkaizomsejten. Ado: adenzin; SA: szintetikus agonista;  $\text{A}_1$ :  $\text{A}_1$  adenzin receptor; metabolitok: az adenzin metabolitjai; G: G protein; AC: adenilcikláz; cAMP: 3',5'-ciklikus adenzin monofoszfát; PK-A: cAMP-függő protein kináz A; PLB: foszfolambán; SERCA: a szarkoplazmatikus retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-áza; foszfatázok: intracelluláris foszfoprotein foszfatázok;  $\text{L}_{\text{Ca}}$ : L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatorna;  $\text{K}_{\text{Ach/Ado}}$ : muszkarin aktiválta  $\text{K}^+$  csatorna;  $[\text{Ca}^{2+}]$ : a citoszól  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációja az akciós potenciál platófázisában; CF: kontrakciós erő;  $\longleftrightarrow$  : egyensúlyi folyamat;  $\longrightarrow$  : serkentés vagy növelés;  $\longrightarrow$  : gátlás vagy csökkentés;  $\uparrow$  illetve  $\downarrow$  : aktiváció vagy növekedés, illetve gátlás vagy csökkenés, melyet az  $\text{A}_1$  receptor agonista okoz az adott struktúrán.

Az adenzin közvetlenül is gátolja az adenilcikláz az ún. P-site-hoz kötődve (Tesmer és mtsai, 2000), ami kismértékben hozzájárul az adenzin negatív inotróp hatásához (összefoglalóként ld.: Gesztelyi és mtsai, 2003b) (7. ábra).

Az A<sub>1</sub> receptor stimulációja mind pitvaron, mind kamrán a nyugalmi szintre képes visszavezetni az adenilcikláz fokozott aktivitását, ami visszaállítja a nyugalmi kontrakciós erőt is (indirekt negatív inotróp hatás). Pitvaron ugyanakkor az A<sub>1</sub> receptor agonisták a nyugalmi szint alá képesek csökkenteni kontrakciós erőt (direkt negatív inotróp hatás), amit a GIRK csatornák supraventricularis jelenlétének tulajdonítanak (Kurachi és mtsai, 1986; Belardinelli és mtsai, 1995).

A jelen disszertáció vizsgálatait tengerimalac pitvaron végeztük, amelyben a cardiomyocyták az adenzin receptorok közül csak az A<sub>1</sub> típust expresszálják (Gardner és Broadley, 1999). A kísérleti állatok közül a tengerimalac A<sub>1</sub> receptora mutatja a legnagyobb homológiát az emberével (2. ábra). Mivel állandó frekvencián ingerelt bal pitvart használtunk, az A<sub>1</sub> receptor negatív inotróp hatásai csak a kontrakciós erő csökkentésében nyilvánultak meg. A kísérletek során az adenilcikláz nem stimuláltuk, tehát az A<sub>1</sub> receptor agonisták direkt negatív inotróp hatását mértük, ami hozzájárult kísérleti modellünk minél egyszerűbbé és ezáltal megbízhatóbbá tételéhez.

## 2.7. A thyreoid hormonok hatása a pitvari A<sub>1</sub> adenzin receptor mediálta negatív inotrópiára

Pajzsmirigyhormon (thyreoid hormon) alatt, összhangban az általános értelmezéssel, a 3,3',5-triiodo-L-tironint (T<sub>3</sub>) és az L-tiroxint (T<sub>4</sub>) értjük a továbbiakban annak ellenére, hogy a kalcitonint is a pajzsmirigy termeli. A pajzsmirigyhormonok (euthyreoid szinthez képesti) többlet mennyisége gyengíti a myocardialis A<sub>1</sub> receptor által mediált hatásokat, köztük a pitvari negatív inotróp hatást is (Szentmiklósi és mtsai, 1992; Kaasik és mtsai, 1994, 1997a). Noha a jelenség háttere még nem teljesen tisztázott, a pitvari A<sub>1</sub> receptor jelátvitelének több résztvevőjéről igazolták, hogy a thyreoid hormonok kontrollja alatt áll.

A pajzsmirigyhormonok kismértékben növelték az A<sub>1</sub> receptor denzitást patkány pitvaron (Kaasik és mtsai, 1994) és kamrán (El-Ani és mtsai, 1994), miközben nem mutatkozott lényeges eltérés a G protein koncentrációjában. Az A<sub>1</sub> receptorszám növekedése természetesen nem magyarázza a válaszkészség csökkenését. El-Ani és mtsai



(1994) vizsgálatában az A<sub>1</sub> receptor trícíált CPX-szel (<sup>3</sup>H]CPX) szembeni affinitásában sem észleltek lényeges változást thyreoid hormonok hatására (a kismértékű csökkenést nem találták szignifikánsnak).

A GIRK áramot változatlanok találták hyperthyreoid patkány pitvaron (Sunagawa és mtsai, 2005), továbbá nyúl pitvaron és kamrán is (Shimoti és Banno, 1993). Ezzel összhangban a GIRK áram nem változott hypothyreoid tengerimalac kamrán sem (Bosch és mtsai, 1999). Másrészt viszont a T<sub>3</sub> akut alkalmazása növelte a GIRK áramot tengerimalac kamrán, melyet a T<sub>3</sub> nem genomikus (nem a génexpresszió módosításán keresztül mediálódó) hatásának tulajdonítottak (Sakaguchi és mtsai, 1996). Ezek alapján valószínűleg a pajzsmirigyhormonok GIRK csatornák feletti kontrollja sem felelős az A<sub>1</sub> receptor mediálta negatív inotróp hatás csökkenéséért hyperthyreoid pitvaron.

Hyperthyreota patkány szívben az adenilcikláz mennyisége nem, de aktivitása csökkenést mutatott az euthyreoid állapothoz képest (Ojamaa és mtsai, 2000a). Ennek ellenére úgy találták, hogy az L-típusú Ca<sup>2+</sup> csatornákat nyitó, az adenilcikláz magába foglaló szignalizációs útvonal összességében inkább aktiválódik hyperthyreoid patkány kamrán (Watanabe és mtsai, 2005).

A pajzsmirigyhormonok növelik a SERCA mennyiségét és ezzel párhuzamosan csökkentik a foszfolambán mennyiségét és aktivitását mind pitvaron, mind kamrán (Kiss és mtsai, 1994; Kaasik és mtsai, 1997a; Ojamaa és mtsai, 2000b; Shenoy és mtsai, 2001). Mivel azonban a foszfolambán szintje pitvaron eleve alacsony (Shenoy és mtsai, 2001), a thyreoid hormonok okozta csökkenés nem rejt magában olyan jelentős szabályozási lehetőséget, mint a kamrán. Ezzel összhangban hyperthyreoid patkány szívben a nyugalmi kontrakciós erő csak a kamrán haladja meg az euthyreoid szintet, a pitvaron változatlan marad (Kaasik és mtsai, 1997a).

Az L-típusú Ca<sup>2+</sup> áramot hyperthyreoid állapotban fokozottnak találták tengerimalac kamrán (Rubinstein és Binah, 1989) és humán pitvaron is (Kreuzberg és mtsai, 2000). Ezzel szemben hyperthyreoid patkány pitvaron kisebb L-típusú Ca<sup>2+</sup> áramot mértek (Sunagawa és mtsai, 2005), míg hyperthyreoid nyúl pitvaron és kamrán nem tapasztaltak változást ebben az áramban (Shimoni és Banno, 1993). Az ellentmondásos eredmények összeegyeztethetőek, ha feltételezzük, hogy a thyreoid hormonok komplex, időfüggő hatással bírnak az L-típusú Ca<sup>2+</sup> áramra. Ezt az elképzelést támogatja az is, hogy patkány kamrán fokozott L-típusú Ca<sup>2+</sup> áramot mértek a T<sub>3</sub> kezelés 4. napján, míg az áram az euthyreoid szint alá csökkent a 8. napra (Watanabe és mtsai, 2005).

Valószínűnek látszik, hogy az adenzin metabolizmusában résztvevő enzimek és transzporterek módosulása is hozzájárul a negatív inotróp hatás csökkenéséhez hyperthyreosisban. Patkány kamrán a pajzsmirigyhormonok növelik a nukleozid transzport kapacitását (Smolenski és mtsai, 1995). Amíg fennáll az adenzinra a fiziológiás (vagyis kívülről a cardiomyocyták belseje felé mutató) hajtóerő, a nagyobb transzportkapacitás csökkenti az extracelluláris adenzin kapcsolódási esélyét a sejt felszíni adenzin receptorokhoz, ami redukálja az extracelluláris adenzinra adott választ. A nukleozid transzport változása azonban csak a transzportábilis és a cardiomyocyták által gyorsan eliminálható adenzin receptor agonisták hatását csökkenti (pl. az adenzinét), ezekre nézve ugyanis tartósan fönnáll a koncentráció-grádiens a sejtmembrán két oldalán (amíg a beadott mennyiség el nem fogy). Ennek megfelelően hyperthyreosisban az adenzin pitvari negatív inotróp hatásának csökkenése látványosan meghaladja a stabil szintetikus A<sub>1</sub> receptor agonisták (pl. CPA) esetén tapasztalható mértéket (Szentmiklósi és mtsai, 1992; Gesztelyi és mtsai, 2003b). Mivel azonban a stabil A<sub>1</sub> receptor agonistákkal szembeni válaszkészség is jelentősen csökken (Szentmiklósi és mtsai, 1992; Gesztelyi és mtsai, 2003b), a fokozott nukleozid transzport kapacitás csak részben tehető felelőssé az adenzin gyengébb hatásáért hyperthyreosisban.

Az adenzin kináz (az intracelluláris adenzin fő eliminálója) aktivitásának növekedését is kimutatták hyperthyreota patkány szívben (Smolenski és mtsai, 1995). A fokozott intracelluláris eliminációs kapacitás hozzájárulhat a bomlékony A<sub>1</sub> receptor agonisták csökkent hatásához, de ez sem magyarázza a stabil A<sub>1</sub> receptor agonistákra adott kisebb választ (Szentmiklósi és mtsai, 1992; Gesztelyi és mtsai, 2003b).

A thyreoid hormonok tehát több támadásponttal és összetett módon befolyásolják a myocardialis A<sub>1</sub> receptorok jelátvitelét. Ennek részletei a kiterjedt vizsgálatok ellenére sincsenek pontosan feltárva, pl. a pitvari A<sub>1</sub> receptor mediálta negatív inotróp hatás csökkenésének mechanizmusa sem teljesen tisztázott. A téma jelentőségét az adja, hogy az adenzin endogén kardioprotektív regulátor, amely részt vesz az ún. ischaemiás prekonkondicionálás jelenségében is, a védőhatás létrehozásában pedig fontos szerep jut a myocardialis A<sub>1</sub> receptornak (Sommerschild és Kirkebøen, 2000, 2002; Fredholm és mtsai, 2001, 2011; Headrick és mtsai, 2003, 2011; Headrick és Lasley, 2009). Kérdésként merül fel, hogy az A<sub>1</sub> adenzinerg hatások gátlása, melynek része a negatív inotrópia mérséklése is, nem rontja-e a fokozott munkára kényszerített hyperthyreoid szív endogén védelmi mechanizmusait, illetve az ezek fokozását célzó terápiás próbálkozások hatékonyságát. A

kérdés bonyolultságát mutatja, hogy a thyreoid hormon többlet a jól ismert kedvezőtlen hatásokon túl (pl. tachycardia, fokozott oxigén-felhasználás, ld.: Pietras és mtsai, 1972; Nabbout és Robbins, 2010) – paradoxnak tűnő módon – az ischaemiás prekondicionáláshoz hasonló jellegű kardioprotektív hatást is létre tud hozni (Ranasinghe és Bonser, 2010; Pantos és mtsai, 2011). Mindent egybevetve, további vizsgálatok szükségesek, amelyek feltárják a pajzsmirigyhormonok myocardialis A<sub>1</sub> adenozinerg rendszerre kifejtett hatásainak eddig felderítetlen részleteit.

## 2.8. A felhasznált kvantitatív farmakodinámiai modellek

### 2.8.1. A Hill egyenlet

A Hill egyenlet a különböző receptorelméletekben betöltött szerepén túl a gyakorlatban is jól használható a ligandkötési vagy E/c görbék jellemzésére. Eredeti formájában ezen görbék alakját három paraméterrel jellemzi, de módosított formái két vagy négy paramétert is tartalmazhatnak (Giraldo és mtsai, 2002; Motulsky és Christopoulos, 2004; Gesztelyi és mtsai, 2012).

Receptor alatt olyan, sejteken vagy sejtekben található makromolekuláris nagyságrendű struktúrát értünk, amely egyrészt bizonyos ligandok specifikus megkötése révén jelfelismerésre képes (kognitív funkció), másrészt a ligand (pontosabban: az agonista ligand) bekötődése után valamilyen változást hoz létre a sejt működésében (transzducer funkció; hatásgenerálás). Ebben a folyamatban részt vehetnek a sejt olyan alkotórészei (enzim, csatorna, transzporter) is, amelyek szorosan véve nem tartoznak a receptorhoz, de a hatás létrehozásában szerepük van (posztreceptorális szignalizáció). A hatásgenerálás során jelerősítés is történhet (főleg akkor, ha posztreceptorális szignalizáció is kapcsolódik a receptorhoz, ami a receptorok többségére igaz).

Egy ligand és a receptora kapcsolatát elsőként Archibald Vivian Hill kvantifikálta (Hill, 1910), de egy azonos tartalmú összefüggést Irving Langmuir is leírt gázok fémfelületen történő adszorpciójára (Langmuir, 1918). Ezek alapján egy nemzetközi ajánlás a ligand és a receptor kapcsolódását kvantifikáló egyenletet Hill-Langmuir egyenletnek

nevezi, míg az agonista koncentrációja és a kiváltott hatás közötti kapcsolatot leíró – formailag azonos – összefüggést Hill egyenletként említi (Neubig és mtsai, 2003).

Ha a ligand(ok) megkötését egy lépésben feltételezzük (1. egyenlet), a tömeghatás törvényének egyensúlyi állapotra felírt formájából (némi egyszerűsítés révén) levezethető a Hill-Langmuir egyenlet (2. egyenlet):



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

ahol:  $L$  – a ligand;  $R$  – a receptor;  $L_nR$  – a ligand-receptor komplex;  $[L_nR]$  – a ligand-receptor komplex koncentrációja;  $[R_0]$  – a összes (szabad és kötött) receptor koncentrációja;  $[L]$  – elvben a szabad ligand koncentrációja, a gyakorlatban a teljes (szabad és kötött) ligand koncentrációval helyettesítik;  $k_1$  illetve  $k_2$  – a ligand-receptor komplex asszociációjának illetve disszociációjának a sebességi állandója;  $K_d = k_2/k_1$  – a ligand-receptor komplex egyensúlyi disszociációs állandója;  $K$  – a féltelítési ligand koncentráció (ha  $n = 1$ , egyenlő a  $K_d$ -vel);  $n$  – az 1. egyenletben a ligand kötőhelyek száma egy receptoron, a 2. egyenlet gyakorlati alkalmazásakor azonban összetett értelmű paraméternek mutatkozott, ezért jobb egyszerűen csak Hill koefficiensnek nevezni (Kenakin, 2009; Gesztelyi és mtsai, 2012).

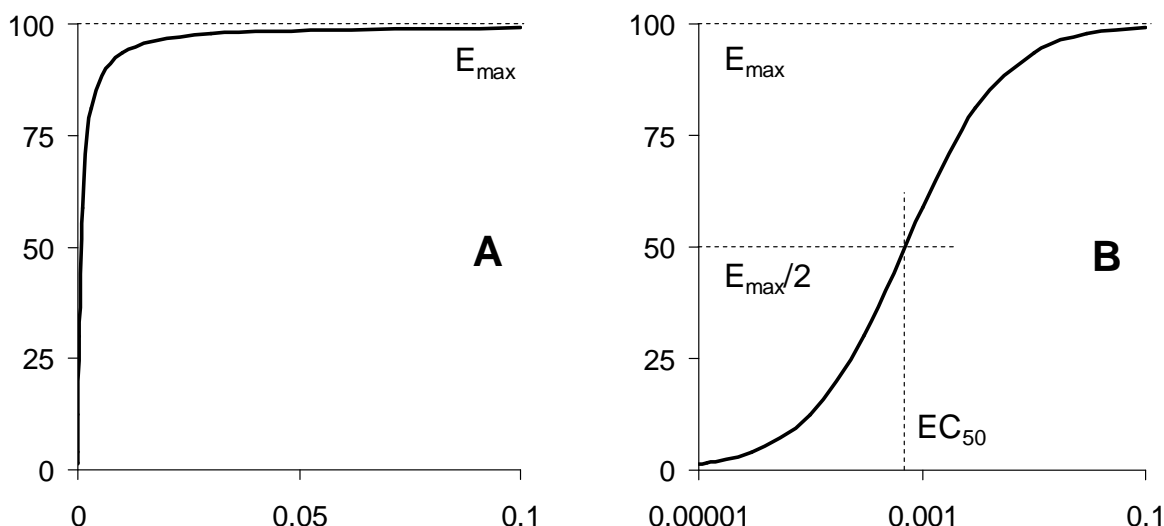
A 2. egyenletben külön figyelmet érdemel a  $K$  állandó, mivel ez a receptor ligandkötő képességének (vagyis az adott ligand receptorhoz való affinitásának) jellemzője. Ha a  $K$  értéke nagy, az affinitás kicsi, míg ha a  $K$  kicsi, nagy affinitásról beszélhetünk. Ha az adott ligand agonista, tehát bekötődés után a receptor szerkezetét módosítva a receptort hordozó sejt működését megváltoztatja, a  $K$ -t szokás  $K_A$ -nak jelölni (ld.: 9. egyenlet). Ha az adott ligand antagonist, vagyis bekötődésének egyetlen következménye, hogy a receptorhoz aktuálisan nem tud agonista kötődni, a  $K$ -t hagyományosan  $K_B$ -nak jelöljük (ld.: 4-6. egyenletek).

A Hill egyenlet az első kvantitatív receptor modell, amelyet napjainkban is széles körben használnak E/c görbék regresszióanalízisére (görbeillesztésre), főleg első tájékozódás céljából (Kenakin, 2009):

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

ahol:  $c$  – az agonista koncentrációja;  $E$  – a hatás;  $E_{\max}$  – az adott rendszerben az adott agonistával elérhető maximális hatás;  $EC_{50}$  – a félhatásos agonista koncentráció;  $n$  – a Hill koefficiens (Hill slope faktor).

A Hill egyenlet által meghatározott függvény lineáris ábrázolás mellett  $n=1$  esetén hiperbola, szemilogaritmikus ábrázolásban (logaritmikus x, lineáris y tengely) viszont minden  $n$  érték esetén szigmoid lefutású (8. ábra). Noha a  $E/c$  görbék sokféle alakot felvehetnek, a tipikus  $E/c$  görbe szemilogaritmikus ábrázolásban szigmoid.



**8. ábra.** A Hill egyenlet lineáris (A) és szemilogaritmikus (B) ábrázolásban. A paramétereket úgy választottuk meg, hogy egy full agonista tipikus  $E/c$  görbét reprezentálják ( $E_{\max}=100\%$ ;  $EC_{50}=700 \mu\text{M}$ ;  $n=1$ ). Az x tengelyen a moláris koncentrációt vettük fel lineáris (A) illetve logaritmikus léptékben (B), az y tengelyen pedig a hatást ábráztuk maximális értékének százalékában. A görbék szimmetrikusak, vagyis logaritmikus x tengely mentén ábrázolva a függvény középpontja ( $EC_{50}$ ;  $E_{\max}/2$ ) egyben az inflexiós pont is (ahonnan az addig növekvő meredekség csökkenni kezd az x tengelyen jobbra haladva). Nem szimmetrikus görbék esetében az inflexiós pont nem az  $EC_{50}$ -nél van.

A Hill egyenlettel végzett regresszióanalízis kétváltozós ( $c$ ,  $E$ ), háromparaméteres ( $E_{\max}$ ,  $EC_{50}$ ,  $n$ ) és nemlineáris (mivel nem az  $y = a \cdot x + b$  képletet követi). Görbeillesztési szempontból a Hill egyenlet igen flexibilis, vagyis jelentős mérési hibával terhelt  $E$  adatok

esetén is használható becslést ad (Giraldo és mtsai, 2002). Farmakológiai szempontból a Hill modell csaknem teljesen független a receptor jelátviteli mechanizmusaitól (bár feltételezi a E/c görbék szimmetriáját, ami esetek többségében teljesül is). Ennek köszönhetően általánosan használható, viszont paraméterei ( $E_{\max}$ ,  $EC_{50}$ , n) empirikusak, vagyis nem fiziko-kémiai állandók (Giraldo és mtsai, 2002).

### 2.8.2. A Schild egyenlet

A Schild egyenlet alkalmazása („Schild analízis”) lehetővé teszi egy antagonistá befolyásának kvantifikálását egy adott agonista által adott biológiai rendszerben (adott receptoron és szövetben) kifejtett hatásra. Kompetitív antagonizmus esetén meghatározható vele az antagonistá adott receptorhoz való affinitása is.

Schild egyenletnek az egyenletek azon csoportját nevezik, amelyek leírják a kapcsolatot egy agonista két olyan koncentrációja között, melyek közül az egyik antagonistá hiányában, a másik pedig antagonistá jelenlétében fejt ki ugyanazt a hatást ugyanabban a biológiai rendszerben. Ezek az egyenletek nem köthetők egyetlen felfedezőhöz, évtizedeken át tartó fejlesztés vezetett a jelenleg ismert változatokhoz és alkalmazási módokhoz (Gaddum, 1937; Clark, 1937; Schild, 1947; Arunlakshana és Schild, 1959; Waud és mtsai, 1978). Az egyenletcsalád neve Heinz Otto Schild alapvető munkásságát ismeri el. A Schild egyenlet legegyszerűbb formája nem tartalmaz hatványkitevőt:

$$\frac{EC_{50}}{EC_{50}^*} - 1 = \frac{[B]}{K} \quad 4. \text{ egyenlet}$$

ahol:  $EC_{50}$  illetve  $EC_{50}^*$  – a félhatásos agonista koncentráció az antagonistá jelenlétében illetve hiányában;  $[B]$  – az antagonistá koncentrációja (amikor jelen van);  $K$  – egy az adott antagonistára és rendszerre jellemző állandó.

Ha az antagonizmus tisztán kompetitív, a  $K$  egyenlő az antagonistá-receptor komplex egyensúlyi disszociációs állandójával ( $K_B$ ). Az  $EC_{50}/EC_{50}^*$  hányadost hagyományosan dózis aránynak (dose ratio: DR) hívják. (Elvben bármely két ekvиеffektív

koncentráció hányadosa beírható a 4. egyenletbe mint dózis arány, de a félhatásos koncentrációk határozhatók meg a legpontosabban.)

Néhány esetben Gaddum és Schild felemelték a [B]-t egy a későbbiekben Schild koefficiensnek (S) elnevezett hatványkitevőre:

$$\frac{EC_{50}}{EC_{50}^*} - 1 = \frac{[B]^S}{K} \quad \text{5. egyenlet}$$

A Schild egyenlet egy másik formájában a dózis arány is fel van emelve egy a Schild koefficiensnél különböző kitevőre. A Schild egyenlet kitevőkkel való ellátásának eredeti koncepciója ugyanaz volt, mint a Hill egyenlet esetében: figyelembe venni a kötési reakció molekularitását, vagyis azon ligandok számát, melyeknek kötődniük kell 1 db. receptorhoz azért, hogy kiváltsák vagy kivédjék a hatást (Gaddum, 1937; Clark, 1937). A későbbiekben azonban tapasztalták, hogy ezeknek a kitevőknek, amennyiben kísérletesen határozzák meg őket, nincs egzakt fiziko-kémiai tartalmuk, sem a Hill koefficiensnek (Katz, 1978; Weiss, 1997; Gesztelyi és mtsai, 2012), sem a Schild koefficiensnek (Colquhoun, 2007).

Később Waud javasolta, hogy a teljes [B]/K hányadost emeljék fel a Schild koefficiensre, ne csak a [B]-t (Waud és mtsai, 1978). Így ugyanis a K közvetlenül megadja az A<sub>2</sub>-t, vagyis azt az antagonistá koncentrációt, amely megduplázza az agonista E/c görbéjének félhatásos koncentrációját (EC<sub>50</sub> = 2 · EC<sub>50</sub><sup>\*</sup>):

$$\frac{EC_{50}}{EC_{50}^*} - 1 = \left( \frac{[B]}{A_2} \right)^S \quad \text{6. egyenlet}$$

Hasonlóan a 4. és 5. egyenlethez, ha az antagonistá tisztán kompetitív, az A<sub>2</sub> egyenlő a K<sub>B</sub>-vel.

Ezen túlmenően Waud kombinálta a Schild és a Hill egyenletet: kifejezte az EC<sub>50</sub>-et a 6. egyenletből és beillesztette a 3. egyenletbe (Waud és mtsai, 1978):

$$E = E_{\max} \cdot \frac{c^n}{c^n + \left( EC_{50}^* \cdot \left( 1 + \left( \frac{[B]}{A_2} \right)^S \right) \right)^n} \quad \text{7. egyenlet}$$

ahol:  $c$ ,  $E$ ,  $E_{\max}$  és  $n$  – a Hill egyenletnél ismertett mennyiségek;  $EC_{50}^*$ ,  $[B]$ ,  $A_2$  és  $S$  – a Schild egyenlet korábbi formáinál definiált mennyiségek.

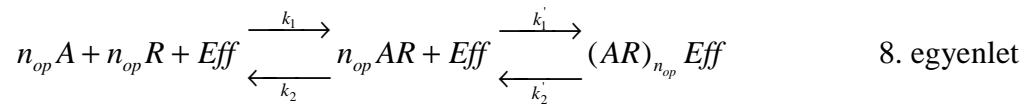
A jelen disszertációban ismertett vizsgálatok során a Schild egyenletnek a 7. egyenletben rögzített formáját alkalmaztuk (és a továbbiakban erre hivatkozunk, mint Schild egyenletre). Ennek oka, hogy a 7. egyenlet (a Hill egyenlet beépítésének köszönhetően) közvetlenül illeszthető a megfelelő E/c görbékre, emellett (a Schild koefficiens pozíciója révén) a korábbi változatoknál megbízhatóbb becslést ad az  $A_2$ -re. A Schild koefficiens kiterjesztése a teljes  $[B]/A_2$  hányadosra ugyanis csökkenti a korrelációt (ami egy bizonyos fajta regressziós hiba) az  $S$  és az  $A_2$  paraméterek között (Lazareno és Birdsall, 1993; Motulsky és Christopoulos, 2004).

A Schild egyenlet illesztése kétváltozós ( $c$ ,  $E$ ), ötparaméteres ( $E_{\max}$ ,  $EC_{50}^*$ ,  $n$ ,  $A_2$  és  $S$ ) nemlineáris regresszióanalízis. A Hill egyenlettel szemben, amelyet egyetlen E/c görbére (illetve ugyanolyan körülmények között felvett E/c görbék átlagára) kell illeszteni, a Schild egyenletet legalább két E/c görbére illesztik: egy natív (antagonistamentes) és egy  $[B]$  koncentrációjú antagonista jelenlétében felvett E/c görbére (a többi körülménynek azonosnak kell lennie). A meghatározás pontosságát növeli, ha többféle  $[B]$  jelenlétében is felvesznek E/c görbét és mindet bevonják a görbeillesztésbe. Az illesztés szimultán („globális”), vagyis az öt illesztett paraméter meg van osztva az összetartozó (csak az antagonista koncentrációjában különböző) E/c görbék között. Ez azt jelenti, hogy az öt paraméter ugyanazon értékeinek kell biztosítani a minél jobb illeszkedést a görbe család tagjaihoz (Motulsky és Christopoulos, 2004).

### 2.8.3. Az agonizmus operatív modellje

A farmakológiai agonizmus operatív modellje a Hill egyenlethez hasonlóan kvantitatív receptor modell, emellett ez sem tartalmaz megkötéseket a receptorműködés mechanizmusára (illetve csak nagyon általánosakat, amelyek a legtöbb receptor esetén teljesülnek). Az operatív modell agonisták receptorhoz való affinitásának és kötődés utáni hatáslétrehozó képességének kvantifikálására alkalmas (Black és Leff, 1983; Giraldo és mtsai, 2002). Az operatív modell alapját egy kétlépéses reakcióegyenlet képezi, amelyben külön van választva a receptor jelfelismerő és transzducer funkciója (Black és Leff, 1983):





ahol (a még elő nem fordult jelölések):  $A$  – az agonista;  $Eff$  – a hatás létrehozásában közreműködő posztreceptorális elemek, melyeknek csak az agonista-receptor komplexhez van számottevő affinitása („effektor”; az 5. ábrán mint „közvetítő” szerepel);  $AR$  – az agonista-receptor komplex;  $(AR)_{n_{op}}Eff$  – az agonista-receptor-effektor komplex;  $k_1'$  illetve  $k_2'$  – az asszociáció illetve a disszociáció sebességi állandója az agonista-receptor-effektor komplex esetében;  $n_{op}$  – az egy agonista-receptor-effektor komplexben lévő agonista-receptor komplexek száma.

A 8. egyenlet első részében szereplő anyagok egyensúlyi koncentrációi kifejezhetőek a Hill-Langmuir egyenlet segítségével, a második részhez tartozó egyensúlyi koncentrációkat pedig egy az előzővel alakilag azonos összefüggés adja meg (Black és Leff, 1983):

$$[AR] = [R_0] \cdot \frac{[A]}{[A] + K_A} \quad 9. \text{ egyenlet}$$

$$[(AR)_{n_{op}} Eff] \sim E = E_m \cdot \frac{[AR]^{n_{op}}}{[AR]^{n_{op}} + K_E^{n_{op}}} \quad 10. \text{ egyenlet}$$

ahol (a még nem definiált jelölések):  $[A]$  – az agonista koncentrációja;  $[AR]$  – az agonista-receptor komplex koncentrációja;  $K_A$  – az agonista-receptor komplex egyensúlyi disszociációs állandója, ami megegyezik a féltelítési agonista koncentrációval, mivel a 9. egyenlet nem tartalmaz (1-től különböző) kitevőt;  $[(AR)_{n_{op}}Eff]$  – az agonista-receptor-effektor komplex koncentrációja (amelyről feltételezzük, hogy egyenesen arányos a hatással);  $E_m$  – az adott rendszerben elérhető maximális hatás;  $K_E$  – a félmáximális  $E_m$ -et létrehozó agonista-receptor komplex koncentráció. A 10. egyenletben szereplő  $n_{op}$ , noha a 8. egyenletből származik, a gyakorlatban inkább a jelátvitel egészét jellemzi, semmint a szignáltranszdukció molekularitását, hasonlóan a Hill-Langmuir egyenlet Hill koefficienséhez a kötődés molekularitását illetően. Ennek megfelelően az  $n_{op}$ -ot általánosságban operatív slope faktornak nevezik.

A 9. egyenlet által kifejezett  $[AR]$ -t beírva a 10. egyenletbe:

$$E = E_m \cdot \frac{([A] \cdot [R_0])^{n_{op}}}{([A] \cdot [R_0])^{n_{op}} + (K_E \cdot ([A] + K_A))^{n_{op}}} \quad 11. \text{ egyenlet}$$

Bevezetve a  $\tau$ -t mint operatív hatékonyságot ( $\tau = [R_0]/K_E$ ), amely az agonista hatáslétrehozó képességének (efficacy) mértéke, továbbá egyszerűsítve az agonista koncentrációjának jelölését ( $[A] = c$ ), a 11. egyenlet a következőképpen alakul:

$$E = E_m \cdot \frac{(c \cdot \tau)^{n_{op}}}{(c \cdot \tau)^{n_{op}} + (c + K_A)^{n_{op}}} \quad 12. \text{ egyenlet}$$

Az operatív modell egyenlete (12. egyenlet) közvetlenül illeszthető a megfelelő E/c görbékre (ld. lentebb), így módon megbecsülhető a  $K_A$ ,  $E_m$  és  $\tau$  értéke (Black és Leff, 1983; Kenakin, 2009). Ezek közül a  $K_A$  fiziko-kémiai állandó, míg az  $E_m$  és a  $\tau$  inkább empirikusak (Giraldo és mtsai, 2002).

Az operatív modell illesztése tehát kétváltozós ( $c$ ,  $E$ ), négyparaméteres ( $E_m$ ,  $K_A$ ,  $\tau$ ,  $n_{op}$ ) nemlineáris regresszióanalízis, amelyet a Schild egyenlethez hasonlóan globálisan kell illeszteni egy natív és egy antagonistá által befolyásolt E/c görbére. Az illesztés során az  $E_m$ ,  $K_A$  és  $n_{op}$  paraméterek kerülnek megosztásra. A Schild analízistől eltérően azonban itt az antagonistá irreverzibilis, egy koncentrációban alkalmazzák (akkorában, hogy jelentősen csökkentse, pl. felezze a natív E/c görbe  $E_{max}$ -át), továbbá szabad formában már nincs jelen a E/c görbe felvételekor (előzőleg kimossák a rendszerből). A két összetartozó E/c görbe tehát a funkcióképes receptorok eltérő koncentrációjában különbözik. Ezt az illesztett egyenlet úgy veszi figyelembe, hogy a  $\tau$  paraméter eltérhet és csak a másik három paraméter kötelezően azonos a natív és a depletált receptorkészletű E/c görbe esetében (Motulsky és Christopoulos, 2004).

Az operatív modellel szemben kritikaként fogalmazódott meg, hogy reakcióegyenlete (8. egyenlet) nem kezeli külön lépésként az agonista-receptor komplex aktiválódását (Colquhoun, 1998, 2006; Bindslev, 2008). Emiatt a 12. egyenlet illesztésével kapott  $K_A$  értékek Colquhoun szerint nem becsülők pontosan az agonista-receptor komplex egyensúlyi disszociációs konstansát (az ún. mikroszkopikus affinitást), mivel ezeket a  $K_A$  értékeket nem csak a mikroszkopikus affinitás határozza meg, hanem az agonista efficacy-je is (melyet meghatároz a receptor aktív konformációba juttatásának képessége is). A 12. egyenlettel meghatározott a  $K_A$  értékeket ezért megkülönböztetésül makroszkopikus affinitásnak nevezte el (Colquhoun, 1998, 2006).

#### 2.8.4. A Furchgott módszer

Furchgott módszerét agonisták affinitásának meghatározására fejlesztette ki. Kivitelezésekor – az operatív módszerhez hasonlóan – a receptorok egy részét véglegesen működésképtelenné kell tenni. A Furchgott módszer megadja az irreverzibilis antagonisták által nem inaktivált receptorok hányadát is (Furchgott, 1966; Furchgott és Bursztyn, 1967).

Mivel a Furchgott módszer natív és depletált receptorkészletű szövetek E/c görbéinek összehasonlításán alapul, a E/c görbéket ugyanúgy kell fölvenni, mint az operatív módszer esetében. Ezután a két összetartozó E/c görbe néhány önkényesen kijelölt hatás értékéhez tartozó agonista koncentrációkat párosítani kell oly módon, hogy a depletált receptorkészlet mellett felvett E/c görbe koncentrációjához ( $c'$ ) kell rendelni a natív E/c görbe ekvifektív koncentrációját ( $c$ ). A derékszögű koordináta rendszerben ábrázolt koncentráció párokra Furchgott egyenletét illesztve megkaphatjuk a használt agonista affinitását a receptorhoz és az irreverzibilis antagonisták által nem inaktivált receptorok arányát a natív receptorokhoz képest:

$$c = \frac{K_A \cdot c' \cdot q}{K_A + c' \cdot (1 - q)} \quad 13. \text{ egyenlet}$$

ahol:  $c$  – a natív E/c görbéhez tartozó agonista koncentráció;  $c'$  – a depletált receptorkészlet mellett felvett E/c görbéhez tartozó agonista koncentráció;  $K_A$  – az agonista-receptor komplex egyensúlyi disszociációs konstansa;  $q$  – a nem inaktivált receptorok hányada az irreverzibilis antagonistával kezelt biológiai rendszerben.

A Furchgott módszer egy kétváltozós ( $c'$ ,  $c$ ), kétparaméteres ( $K_A$ ,  $q$ ) nemlineáris regresszióanalízis. Egyenletét egyetlen E/c görbére kell illeszteni, amelyet egy natív és egy részlegesen inaktivált receptorkészlet mellett felvett E/c görbe adataiból lehet meghatározni. Hátránya, hogy a korábban tárgyalt módszerekkel szemben egyenlete nem illeszthető közvetlenül E/c görbékre illetve görbecsaládokra (Furchgott, 1966; Furchgott és Bursztyn, 1967).

Az operatív modellel szembeni kritika a Furchgott módszert is érinti, mivel ez utóbbi is a 8. egyenletben vázolt reakcióegyenletből indul ki. Eszerint a 13. egyenlet illesztésével meghatározott  $K_A$  értékek is az ún. makroszkopikus affinitást határoznák meg, mint a 12. egyenlet illesztésével kaptak (Colquhoun, 1998, 2006).

### 2.8.5. A receptoriális válaszkészség módszer (RRM)

A receptoriális válaszkészség módszer (receptorial responsiveness method: RRM) egy agonista receptorközeli koncentrációjának akut növekedését képes kvantifikálni. A körülményektől függően közvetlenül is megadhatja az agonista koncentráció-növekményét, de e helyett általában egy másik agonista előbbivel ekvieffektív koncentrációját szolgáltatja (Gesztelyi és mtsai, 2004).

Az RRM elvét a következő gondolat kísérlet szemlélteti. Vegyünk egy biológiai rendszert és egy agonistát, amelyik szelektíven izgatja a rendszerben található egyik receptort. Ha az adott agonista egy dózisát kétszer adjuk be a rendszerbe, de a második beadás során kiindulási állapotnak az első dózis bemérése után kialakult állapotot vesszük, kisebb választ tapasztalunk, mint elsőre. Ezt a jelenséget az magyarázza, hogy az első dózissal beadott agonista molekulák a receptorok egy részéhez kötődve és azokon hatás kiváltva „elhasználták” a rendszer válaszkészségének egy részét. Emiatt a második dózissal bemért agonista molekulák számára már kevesebb szabad receptor és a maximálisnál kisebb válaszkészség állt rendelkezésre. Ha a kérdéses dózis akkora, ami már az első beadáskor (gyakorlatilag) maximális választ vált ki, másodjára adva teljes válaszképtelenséget tapasztalunk.

Ez a jelenség nem a receptorok deszenzitizációján alapszik. Deszenzitizációról akkor beszélünk, amikor a hatás korrekt meghatározás esetén is elmarad a várakozástól (tehát akkor is, ha a beadott agonista csak szabad kötőhelyű receptorokkal találkozik). A fenti esetben azért kaptunk csökkent választ, mert nem vettük figyelembe a rendszerben lévő agonista molekulák egy részét és az ezek által kiváltott hatást. Olyan rendszerben mértünk tehát kisebb választ, amely az első agonista dózis eltávolítása után a második dózistra a szokásos nagyságú választ adta volna.

A fentiekben bemutatott jelenség akkor is megfigyelhető, ha a másodjára beadott agonista más, mint az első, csak a sejtben ugyanazt (vagy nagyjából ugyanazt) a jelátviteli rendszert használják, tehát ugyanazt a „válaszadási kapacitást” fogyasztják. Ehhez elég, ha ugyanazon a receptoron agonisták, sőt már az is, ha különböző receptorhoz kötődve, de ugyanolyan módon befolyásolják ugyanazt (vagy nagyjából ugyanazt) a szignalizációt (Gesztelyi és mtsai, 2004; Greczer és mtsai, 2010a, 2010b).

Nevezzük a biológiai rendszerbe elsőként kerülő és a későbbiekben figyelmen kívül hagyott agonistát torzító agonistának, míg a rendszerbe másodjára kerülő és figyelembe vett agonistát teszt agonistának. Nevezzük továbbá azt a hatást, melyet a teszt agonista a torzító agonista jelenlétében hoz létre, torzult hatásnak, míg a teszt agonista és a torzító agonista korrekt kiértékelés esetén kapható közös hatását torzítatlan hatásnak. A torzult és a torzítatlan hatás között a következő összefüggés áll fenn (Gesztelyi és mtsai, 2004; Greczer és mtsai, 2010a):

$$E' = 100 - \frac{100 \cdot (100 - E)}{100 - E_{bias}} \quad 14. \text{ egyenlet}$$

ahol:  $E'$  – a torzult hatás (melyet a teszt agonistának tulajdonítunk, de valójában a torzító agonistával közösen kiváltott hatás, ami a torzító agonista figyelmen kívül hagyása miatt inkorrekt);  $E$  – a torzítatlan hatás (a teszt agonista és a torzító agonista korrekt kiértékeléssel kapott közös hatása);  $E_{bias}$  – az hatás, melyet a torzító agonista önmagában hoz létre (és ami figyelmen kívül van hagyva a torzult hatás meghatározásakor).

Amennyiben egy rendszerben valamely okból megnő egy agonista koncentrációja, a 14. egyenlet alapján bizonyos (később részletezendő) feltételek teljesülése esetén lehetőség van az adott agonista többlet (mint torzító agonista koncentráció) kvantifikálására. A meghatározás pontosságához minél több adatra van szükség. Ezt legjobban két E/c görbe felvétele biztosítja az adott rendszerben: az elsőt a torzító agonista többlet hiányában, a másodikat pedig jelenlétében kell felvenni.

A torzító agonista koncentráció becsléséhez definiálni kell a hatás és a hatást létrehozó agonista koncentráció közötti kapcsolatot. Mivel az E és az  $E_{bias}$  egyaránt torzítatlan hatások, kifejezhetők bármely olyan modell alapján, ami kvantifikálja a E/c kapcsolatot. Az egyik legegyszerűbb és legáltalánosabb ilyen modell a Hill egyenlet, amely a hatást az agonista koncentrációjára és három empirikus paraméterre ( $E_{max}$ ,  $EC_{50}$ , n) vezeti vissza (Gesztelyi és mtsai, 2012).

A Hill egyenlet és a 14. egyenlet kombinálásával a torzult hatás visszavezethető a torzító agonista koncentrációra, a teszt agonista koncentrációjára és az intakt (torzítatlan) E/c kapcsolat Hill modell szerinti jellemzőire ( $E_{max}$ ,  $EC_{50}$ , n) (Gesztelyi és mtsai, 2004; Greczer és mtsai, 2010a). A torzult hatás értékeket a torzító agonista jelenlétében felvett E/c görbe szolgáltatja, a Hill paramétereiket pedig a torzító agonistától mentes E/c görbe (a

teszt agonista koncentrációk megegyeznek a két E/c görbénél). Az RRM kombinált egyenlete tehát egyetlen variábilis paramétert tartalmaz, ez a torzító agonista koncentrációja, amelyet úgy kaphatunk meg, ha a kombinált egyenletet a torzító agonista jelenlétében felvett E/c görbére illesztjük.

A torzító agonista koncentrációját ( $c_{bias}$ ) meg kell különböztetni az RRM egyenlete által szolgáltatott becsléstől ( $c_x$ ), mivel nem feltétlen ugyanarra az agonistára vonatkoznak (tehát számértékre sem egyeznek meg szükségszerűen). Ez alapján az RRM egyenlete:

$$E' = 100 - \frac{100 \cdot \left( 100 - E_{max} \cdot \frac{(c_x + c_{test})^n}{(c_x + c_{test})^n + EC_{50}^n} \right)}{100 - E_{max} \cdot \frac{c_x^n}{c_x^n + EC_{50}^n}} \quad 15. \text{ egyenlet}$$

ahol:  $E'$  – a torzult hatás (a  $c_{bias}$  figyelmen kívül hagyásával meghatározott hatás);  $c_{test}$  – a teszt agonista koncentráció (a E/c görbék felvétele során beadott agonista koncentrációja);  $E_{max}$ ,  $EC_{50}$  és  $n$  – az első ( $c_{bias} = 0$ ) E/c görbének a Hill egyenlet illesztése révén nyert paraméterei (az intakt E/c kapcsolat leírói);  $c_x$  – a teszt agonista azon koncentrációja, amely ekvifektív a  $c_{bias}$ -szel (vagyis a  $c_x$ -ből számolható hatás egyenlő a torzító agonista koncentráció által kiváltott hatással:  $E_x = E_{bias}$ ).

Az RRM nem igényli a teszt és a torzító agonista egyezését, csak azonos hatást kell kiváltaniuk ugyanazon a sejten. Ha a teszt és a torzító agonista ugyanaz, az RRM közvetlenül a torzító agonista koncentrációját becsli ( $c_x = c_{bias}$ ). Ha nem, az RRM azt a teszt agonista koncentrációt adja meg, amelyik egyenlő hatást képes kifejteni a torzító agonista koncentrációval (vagyis  $c_x \neq c_{bias}$ , de  $E_x = E_{bias}$ ) (Gesztelyi és mtsai, 2004; Greczer és mtsai, 2010a). Noha a konkrét koncentráció-becslés hasznosabb eredmény, mint az ekvifektív koncentráció becslése, lehet előnye is annak, ha a torzító és a teszt agonista nem azonos. A teszt agonista stabilitása és jó diffúziója növeli a meghatározás pontosságát. Ezáltal az, hogy az RRM megengedi a torzító és a teszt agonista különbözőségét, lehetővé teszi, hogy bomlékony torzító agonisták koncentráció-növekedését stabil teszt agonisták segítségével becsüljük meg, még ha csak egy ekvifektív koncentráció formájában is. Az RRM legfontosabb előnye, hogy egy olyan nehezen vizsgálható szöveti kompartmentről ad információt, mint a receptorok mikrokörnyezete (Gesztelyi és mtsai, 2004; Karsai és mtsai, 2006, 2007).

Az RRM tehát kétváltozós ( $c_{\text{test}}, E'$ ), egyparaméteres ( $c_x$ ) nemlineáris regresszióanalízis. Noha egyenletét (amelyik a Hill modell felhasználása esetén a 15. egyenlet) csak egy E/c görbére kell illeszteni, a meghatározás igényli egy natív (torzítatlan) E/c görbe felvételét is ugyanabban a rendszerben (Gesztelyi és mtsai, 2004; Greczer és mtsai, 2010a).

Az RRM alkalmazásának több feltétele is van, amelyek teljesülése befolyásolja a módszer pontosságát (Gesztelyi és mtsai, 2004; Greczer és mtsai, 2010a, 2010b):

1. A hatásnak jól mérhetőnek kell lennie.
2. A teszt agonista legyen stabil és jól penetráló (és ezáltal a koncentrációk is pontosan számolhatóak – esetleg mérhetőek – legyenek).
3. A  $c_{\text{bias}}$  nem változhat a második E/c görbe felvétele alatt.
4. Az  $E_{\text{bias}}$  a teszt agonista torzítatlan E/c görbéjén – szemilogaritmikus ábrázolás mellett – essen az alsó és felső görbület közötti kvázi lineáris szakaszra. (Ez a feltétel előre nem ellenőrizhető, de általában nem okoz problémát, mivel a kvázi lineáris E/c görbe szakasz magába foglalja az adott receptor biológiai szerepe szempontjából legfontosabb koncentráció-tartományt.)
5. A meghatározás alatt a receptorok érzékenysége nem változhat. Mivel agonista (főleg full agonista) tartós expozíciója esetén a receptorok előbb vagy utóbb deszenzitizálódnak, az RRM az akut koncentráció-növekedés becslésére alkalmas lassan deszenzitizáló receptorok környezetében.
6. Ha a torzító és a teszt agonista nem azonos, farmakodinámiás tulajdonságaiknak hasonlítaniuk kell egymásra. Ha választani lehet a torzító agonistáénál kisebb illetve nagyobb hatáskiváltó képességű (efficacy-jű) teszt agonista között, a kisebbet érdemes választani. A teszt agonista efficacy-jének alsó korlátját az a jelenség jelöli ki, amikor a  $c_{\text{bias}}$  jelenlétében a teszt agonista koncentráció-függő negatív hatást vált ki (ilyen E/c görbére az RRM egyenlete nem illeszthető).
7. A teszt agonista  $E_{\text{max}}$ -ának érdemes közel lennie a torzító agonista  $E_{\text{max}}$ -ához az adott rendszerben. Ebben az esetben ugyanis, ha az  $E_{\text{bias}}$  a teszt agonista torzítatlan E/c görbéjének középső szakaszára esik, akkor a torzító agonista saját E/c görbéjén is a középső szakaszra fog esni, ami növeli a becslés pontosságát. Ez a szempont lehetőleg ne ütközzön a 6. pontban megfogalmazottakkal.

## 3. Anyagok és módszerek

### 3.1. Vegyszerek és oldatok

Az általunk használt vegyszerek: Na-levotiroxin pentahidrát (T<sub>4</sub>, tiroxin), NECA (5'-(N-ethylcarboxamido)adenosine), CPA (N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine), CHA (N<sup>6</sup>-cyclohexyladenosine), CPX (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine), FSCPX (8-cyclopentyl-N<sup>3</sup>-[3-(4-(fluorosulfonyl)benzoyloxy)propyl]-N<sup>1</sup>-propylxanthine), NBTI (S-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine) és adenzin, melyeket a Sigma-tól (St. Louis, MO, USA) vásároltunk.

A tiroxint 0.01% NaOH tartalmú fiziológiás sóoldatban oldottuk. Az adenzint 36°C-os módosított Krebs-Henseleit pufferben (Krebs-oldat) oldottuk fel. A NECA, CPA és CHA oldószere 36°C-os 1:4 etanol:víz (v/v) oldat volt. A CPX, FSCPX és NBTI oldása dimetil-szulfoxidban (DMSO) történt. Minden törzsoldat 10 mM-os volt, kivéve azt, amelyet a 3 mM-os szervkádbeli adenzin koncentráció elérésére használtunk (erre a célra 20 mM-os adenzin törzsoldatot készítettünk közvetlenül a felhasználás előtt).

A törzsoldatok hígításához Krebs-oldatot használtunk. A Krebs-oldat összetétele (mM-ban) a következő volt: NaCl: 118, KCl: 4.7, CaCl<sub>2</sub>: 2.5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1, MgCl<sub>2</sub>: 1.2, NaHCO<sub>3</sub>: 24.9, glükóz: 11.5, aszkorbinsav: 0.1 (bidesztillált vízben). Az etanol illetve DMSO szervkádbeli koncentrációi nem haladták meg a 0.23%-ot illetve 0.1%-ot (v/v).

### 3.2. Állatok és preparátumok

Kísérleteinkhez 500-900 g testtömegű hím tengerimalacokat használtunk fel. Az állatok tartása, előkezelése és feldolgozása összhangban volt a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottságának Etikai Kódexével és a vonatkozó Európai Unió elírásokkal (DE MÁB 35/2007.).



### 3.2.1. *In vivo* tiroxin-kezelés

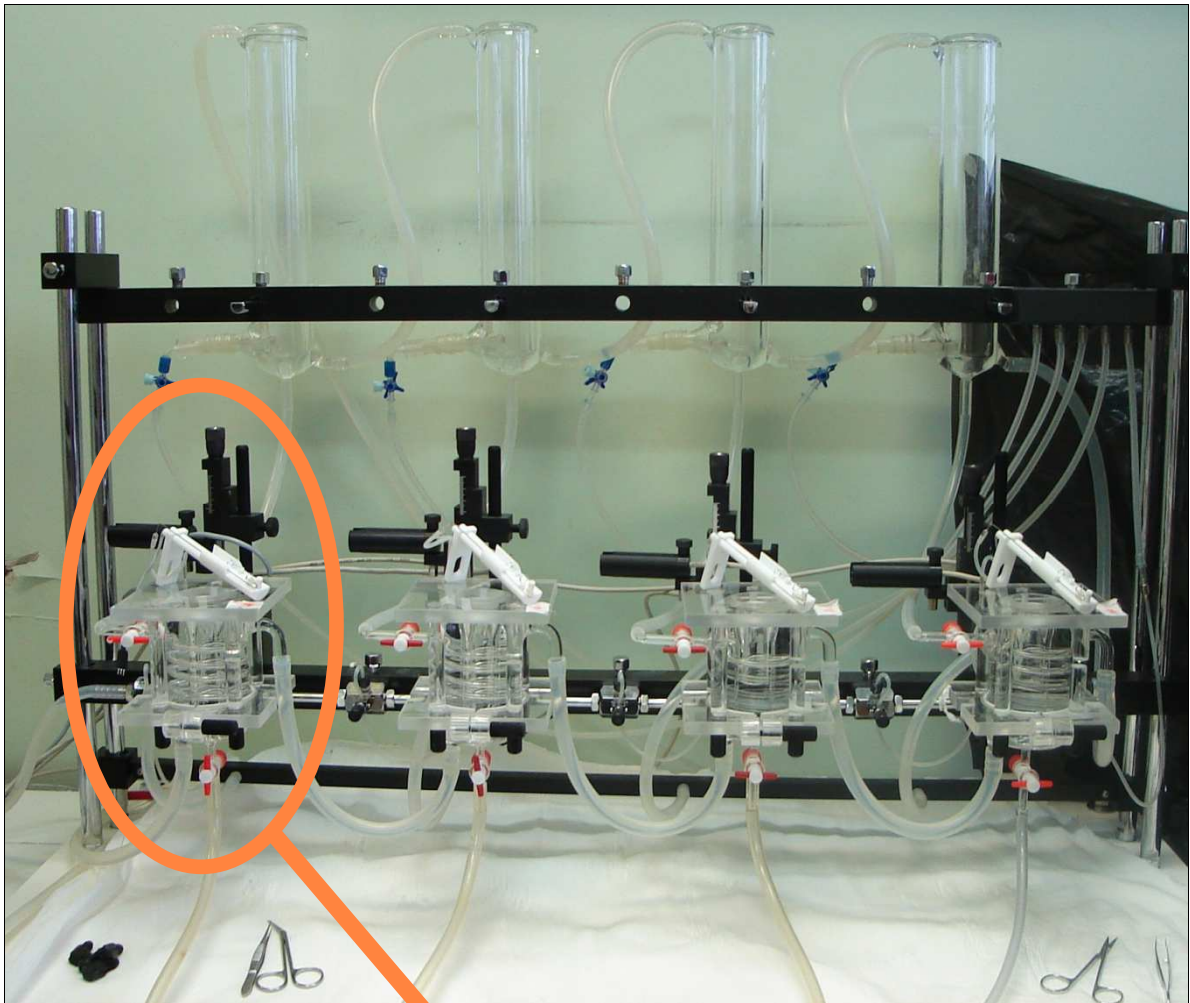
Az első vizsgálati modellben résztvevő állatok egyik része naponta 330 µg/kg Na L-tiroxin pentahidrátot kapott 8 napon keresztül ip. (*in vivo* tiroxin-kezelés), míg a többi állat 8 napon át a tiroxin oldószerét kapta ip. (*in vivo* oldószer-kezelés). Az állatokat a kilencedik napon használtuk fel.

### 3.2.2. *A bal pitvarok preparálása*

A dekapitált állatokból kivágott bal pitvarokat 10 millinewton (mN) nyugalmi feszülés mellett Krebs-oldatot tartalmazó 10 ml-es szervkádakban (TSZ-04, Experimetria, Budapest) függesztettük fel (9. ábra). A Krebs-oldatot karbogénnel (95% O<sub>2</sub> és 5% CO<sub>2</sub>) szellőztettük (pH=7,4; 36 °C). A pitvarok platinaelektrodon keresztüli pontszerű ingerlését a felfüggesztés után azonnal megkezdtük egybeépített programozható stimulátor (ST-02, Experimetria, Budapest) és erősítő (PST-02, Experimetria, Budapest) segítségével a küszöbfeszültség kétszeresét alkalmazva (kb. 1 V, 3 Hz, 1 ms impulzusszélesség). A kontrakciós erőt az izometriás összehúzódások amplitúdójával jellemeztük, amit transzducerrel (SD-01, Experimetria, Budapest) és jelerősítővel (SG-01D, Experimetria, Budapest) mértünk, valamint poligráffal (R-61 6CH, Medicor, Budapest) rögzítettünk.

## 3.3. Kísérleti protokollok és csoportok

A disszertáció két fő célkitűzésének megfelelően az alkalmazott kísérleti protokollok két vizsgálat valamelyikéhez tartoztak. Az első vizsgálati modell célja a tiroxin-kezelés hatásának felderítése volt a tengerimalac pitvari A<sub>1</sub> receptor ortoszterikus kötőhelyének affinitására, a másodiké pedig a tengerimalac pitvari A<sub>1</sub> receptor rezerv nagyságának meghatározása a direkt negatív inotróp hatásra nézve.



**9. ábra.** Izolált szervi kádak, tetejükön fehér teflon szervtartó, amely használatkor a szervkád belsejébe kerül.

Az első vizsgálati modellhez két protokoll tartozott. Az 1. protokoll során az A<sub>1</sub> receptor agonista az adenzin volt, a 2. során a CPA. A második vizsgálati modell hét protokollból állt. Az első négy és az utolsó protokollhoz szintetikus A<sub>1</sub> receptor agonistákat (NECA, CPA, CHA) is használtunk, míg az 5. és 6. protokollhoz csak adenzint.

### 3.3.1. Az A<sub>1</sub> adenzin receptor CPX iránti affinitásának vizsgálata adenzinnal

Az 1. protokollhoz két csoport tartozott: az S1 (n=9) és a T1 (n=9) csoport. Az S és a T betűk (itt és a későbbiekben is) az állatok *in vivo* oldószer- („solvent”) és tiroxin-kezelésére utalnak, a szám pedig (itt és később is) a protokoll száma.

**1. protokoll:** Az S1 és T1 csoportok pitvarai (az elektromos ingerlés megkezdése után) 25-30 percig Krebs-oldatban inkubálódtak, majd 100 µM adenzint kaptak 1-2 percre („edzés”). 15 perces mosás után a pitvarokhoz 10 µl DMSO-t adtunk (mint a CPX oldószerét), majd kumulatív E/c görbét vettünk fel rajtuk adenzinnal (*S1 Kontroll görbe*). Ezután 15 perces mosás jött, majd 20 perc *in vitro* kezelés 0.1 µM CPX-szel, utána (mosás nélkül) egy újabb kumulatív E/c görbe adenzinnal (*S1 0.1 µM CPX görbe*). 15 perc mosás után 20 perc *in vitro* kezelés jött 1 µM CPX-szel, majd kumulatív E/c görbe adenzinnal (*S1 1 µM CPX görbe*). Újabb 15 perces mosás után 20 perc *in vitro* kezelés következett 10 µM CPX-szel, azután kumulatív E/c görbe adenzinnal (*S1 10 µM CPX görbe*).

### 3.3.2. Az A<sub>1</sub> adenzin receptor CPX iránti affinitásának vizsgálata CPA-val

A 2. protokoll hat csoportot foglalt magába: S2 Kontroll (n=10), S2 1 µM CPX (n=7), S2 10 µM CPX (n=7), T2 Kontroll (n=9), T2 1 µM CPX (n=7), valamint T2 10 µM CPX (n=7).

**2. protokoll:** 40-45 perces inkubációt követően először minden pitvaron felvettünk egy kumulatív adenzin E/c görbét. (Ennek célja egyrészt a pitvarok edzése volt, másrészt az adenzinnal szembeni válaszkészség felmérése. Az adenzin azért alkalmas erre a célra, mivel gyors metabolizmusa miatt hamar eliminálódik a preparátumból és nem hagy maga után zavaró bomlástermékeket (Wilbur és Marchlinski, 1997).) Ezután 15 perc mosás következett, majd 20 perc *in vitro* kezelés jött a következő elrendezésben: a két kontroll

csoporthoz 10 µl DMSO-t kaptak, az S2 1 µM CPX és T2 1 µM CPX csoportban a pitvarokhoz 1 µM CPX-et adtunk, míg az S2 10 µM CPX és T2 10 µM CPX csoport pitvarai 10 µM CPX-et kaptak. Ezt követően (előzetes mosás nélkül) kumulatív E/c görbét vettünk fel minden pitvaron CPA-val. (A CPA lassú eliminációja miatt (Pavan és IJzerman, 1998; Gesztelyi és mtsai, 2004) igen lassan mosható ki a pitvarokból, ezért lemondunk az önkontrollos kísérleti elrendezésről, helyette külön kontroll illetve CPX-kezelt csoportokat alakítottunk ki.)

### 3.3.3. Az FSCPX tulajdonságainak vizsgálata izolált pitvaron

A 3., 4. és 5. protokoll egyaránt két-két csoportot foglalt magába, melyeket a nevükben szereplő N (= *in vitro* oldószer-kezelt) és X (= *in vitro* FSCPX-előkezelt) betűk különböztetnek meg: NECA N25 (n=3), NECA X25 (n=3), NECA N-W (n=3), NECA X-W (n=3), NECA N+W (n=3) és NECA X+W (n=3).

40-45 perces Krebs-oldatban való inkubáció után a pitvarokon kumulatív E/c görbét vettünk fel adenzinnal (edzés és az adenzinnal szembeni válaszkészség felmérése céljából). 15 perc mosás után protokollfüggő *in vitro* kezelés következett:

**3. protokoll:** 25 perc inkubáció 10 µl DMSO-val (NECA N25 csoport) illetve 10 µM FSCPX-szel (NECA X25 csoport), majd 75 perc mosás;

**4. protokoll:** 10 perc inkubáció 10 µl DMSO-val (NECA N-W csoport) illetve 10 µM FSCPX-szel (NECA X-W csoport), melyet nem követ mosás;

**5. protokoll:** 45 perc inkubáció 10 µl DMSO-val (NECA N+W csoport) illetve 10 µM FSCPX-szel (NECA X+W csoport), majd 120 perc mosás.

Az *in vitro* kezelés után valamennyi pitvaron kumulatív E/c görbét vettünk fel NECA-val.

### 3.3.4. Az A<sub>1</sub> adenzin receptor rezerv vizsgálata NECA-val, CPA-val és CHA-val

A 6. protokollhoz eredetileg hat csoport tartozott: NECA N (n=8), NECA X (n=7), CPA N (n=7), CPA X (n=7), CHA N (n=7) és CHA X (n=6). Az N illetve az X a csoportok

nevében az *in vitro* oldószer- illetve FSCPX előkezelésre utal. Később, a 8. és 9. protokoll kivitelezésével egyidejűleg két újabb csoporton is végrehajtottuk a 6. protokollt, ezek voltak a P6 Kontroll (n=11) és P6 FSCPX (n=12). A P6 Kontroll csoport protokollja megegyezett a CPA N csoportéval, a P6 FSCPX csoport protokollja pedig a CPA X csoportéval. (A kísérletek megismétlésére azért volt szükség, hogy azon az állatállományon is meglegyenek a 6. protokoll által biztosított az adatok, amelyen a 8. és 9. protokoll készült.)

**6. protokoll:** 40-45 perc Krebs-oldatban való inkubáció után a pitvarokon kumulatív adenzin E/c görbét vettünk fel (edzés és az adenzinnal szembeni válaszkészség felmérése céljából). 15 perc mosás után 45 perc inkubáció következett 10 µl DMSO-val (N jelzésű csoportok) illetve 10 µM FSCPX-szel (X jelzésű csoportok), melyet 75 perc mosás követett. Az *in vitro* kezelés után minden pitvaron kumulatív E/c görbét vettünk fel a csoportnévben jelzett szintetikus A<sub>1</sub> receptor agonistával.

### 3.3.5. Az A<sub>1</sub> adenzin receptor rezerv vizsgálata adenzinnal: első próbálkozás

A 7. protokollhoz egyetlen kísérleti csoport tartozott: P7 csoport (n=8).

**7. protokoll:** 25-30 perc Krebs-oldatban való inkubációt követően a pitvarok 100 µM adenzint kaptak 1-2 percre (edzés). 15 perc mosás után a pitvarokhoz 10 µl DMSO-t adtunk (mint az FSCPX oldószerét), majd kumulatív E/c görbét vettünk fel rajtuk adenzinnal (*P7 Kontroll görbe*). 15 perc mosás után 45 perc inkubáció következett 10 µM FSCPX-szel, majd 75 perc mosás. Ezután újabb kumulatív adenzin E/c görbét vettünk fel (*P7 FSCPX görbe*).

### 3.3.6. Az A<sub>1</sub> adenzin receptor rezerv vizsgálata adenzinnal: második próbálkozás

A 8. protokollhoz szintén egyetlen csoport tartozott: P8 (n=7).

**8. protokoll:** 25-30 perc Krebs-oldatban való inkubáció után a pitvarok 100 µM adenzint kaptak 1-2 percre. 15 perc mosást követően a pitvarokhoz 10 µl DMSO-t adtunk, majd kumulatív E/c görbét vettünk fel rajtuk adenzinnal (*P8 Kontroll görbe*). 15 perc

mosás után a pitvarokat 15 percig inkubáltuk 10 µM NBTI jelenlétében. Ezután (előzetes mosás nélkül) kumulatív adenzin E/c görbét vettünk fel (*P8 NBTI görbe*). 20 perc mosás után 45 perc inkubáció következett 10 µM FSCPX-szel, majd 60 percig mostuk a preparátumokat. Ezt követően a pitvarokat 15 percig inkubáltuk 10 µM NBTI-vel, majd (szintén mosás nélkül) újabb kumulatív adenzin E/c görbét vettünk fel (*P8 FSCPX+NBTI görbe*).

### 3.3.7. Az $A_1$ adenzin receptor rezerv vizsgálata adenzinnal: harmadik próbálkozás

A 9. protokollhoz két csoport tartozott: P9 Kontroll (n=8) és P9 NBTI (n=8).

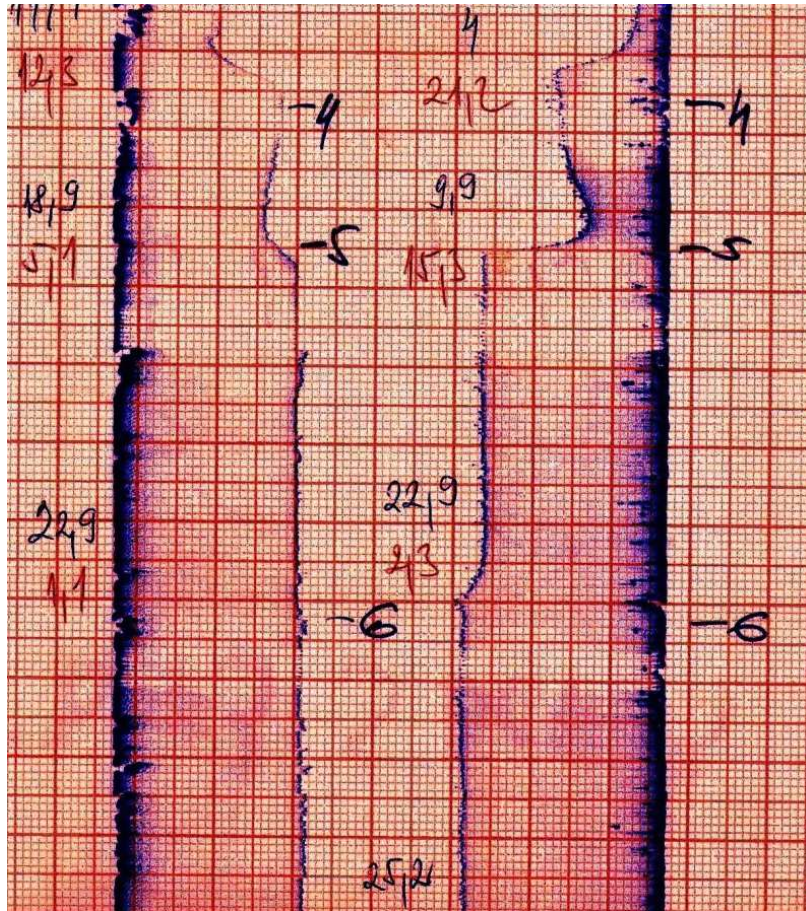
**9. protokoll:** 40-45 perc Krebs-oldatban való inkubáció után a pitvarokon kumulatív E/c görbét vettünk fel adenzinnal (az edzés és az adenzinerg válaszkészség felmérése érdekében). 15 perc mosás után a pitvarokat 15 percig inkubáltuk 10 µl DMSO (P9 Kontroll csoport) illetve 10 µM NBTI (P9 NBTI csoport) jelenlétében. Ezután (előzetes mosás nélkül) kumulatív CPA E/c görbét vettünk fel.

### 3.4. A koncentráció-hatás görbék kiértékelése

Kiértékeléskor a sűrűn egymás után regisztrált egyedi rángások alsó és felső burkológörbéjének távolságát (amplitúdó) vettük figyelembe, mint kontrakciós erőt (10. ábra). A E/c görbe adott koncentrációjának beadása után megkerestük a kialakult legkisebb kontrakciós erőt és ezt használtuk fel a hatás (válasz) kiszámolásához. Hatásként a pitvarok kiindulási kontrakciós erejének százalékos csökkenését definiáltuk:

$$E = \frac{F_0 - F}{F_0} \cdot 100\% \quad 16. \text{ egyenlet}$$

ahol:  $E$  – a hatás;  $F_0$  – a E/c görbe kiindulási kontrakciós ereje;  $F$  – az aktuális kontrakciós erő.



**10. ábra.** A regisztrátum egy oldószer- (jobbra) és egy tiroxin-kezelt (balra) bal pitvar kontrakciós erejét mutatja 1, 10 és 100  $\mu\text{M}$  adozin (a 6-os, 5-ös és 4-es jelzés a regisztrátumon) hatására (előzetes *in vitro* kezelés nélkül). A hőmérőkarral sűrűn egymás után regisztrált egyedi rángások folytonos kék csíkká olvadtak össze. A csíkok külső szélei az alapfeszülést, belső szélei pedig a maximális összehúzódást jelzik, a külső és belső szél távolsága a rángások amplitúdója.

A E/c görbék empirikus jellemzése céljából a Hill egyenletet (3. egyenlet) illesztettük, mind az egyedi, mind átlagolt E/c görbékre. Átlagolásakor az azonos koncentrációhoz tartozó hatások számtani közepét képeztük azon E/c görbék esetében, amelyek ugyanabba a csoportba tartoztak és ugyanazzal az agonistával lettek felvéve ugyanazon antagonisták jelenlétében (ha volt jelen antagonisták). Az egyedi E/c görbék empirikus paramétereit a csoportok összehasonlításához használtuk fel. Néhány csoport esetében az átlagolt E/c görbék empirikus paramétereit bizonyos számításokhoz kellett.

### 3.5. Az $A_2$ illetve a $K_B$ meghatározása

A Schild egyenletet (7. egyenlet) Motulsky és Christopoulos (2004) ajánlása szerint globálisan illesztettük az 1. és 2. protokoll görbecsaládjaira:

1. az S1 csoport négy adenzin E/c görbéje;
2. a T1 csoport négy adenzin E/c görbéje;
3. a három S2 csoport CPA E/c görbéi;
4. a három T2 csoport CPA E/c görbéi.

A Schild egyenletet mind variábilis, mind rögzített ( $S=1$ ) Schild koefficienssel illesztettük. A két modell illeszkedésének F teszttel való összehasonlítása után a jobb illeszkedés mellett kapott paramétert fogadtuk el. Ha  $S=1$  mellett volt jobb az illeszkedés, a kapott  $A_2$  értéket egyszersmind  $K_B$ -nek is tekintettük.

A Schild egyenletet a E/c görbék átlagolt adataira illesztettük. Az átlagolás kiegyenlítette az egyedi görbék biológiai variabilitását és a mérési hibákat, ami növelte a kapott regressziós paraméterek megbízhatóságát. Ez különösen fontos volt a 2. protokoll esetében. A CPA lassan eliminálódik kísérleti rendszerünkben (Gesztelyi és mtsai, 2004), ezért a hosszú kimosási idő elkerülése érdekében egy preparátumon csak egy CPA E/c görbét vettünk fel. Emiatt a 2. protokoll során lemondtunk az önkontrollos kísérleti elrendezésről, így a natív és az egyes antagonisták koncentrációk jelenlétében felvett E/c görbék külön-külön csoportokból kerültek ki.

### 3.6. A $K_A$ meghatározása

#### 3.6.1. A $K_A$ becslése az operatív modell felhasználásával

Az operatív modell egyenletét (12. egyenlet) Motulsky és Christopoulos (2004) ajánlása alapján globálisan illesztettük a 6. és 7. protokoll görbecsaládjaira:

1. a NECA N és NECA X csoportok NECA E/c görbéi;
2. a CPA N és CPA X csoportok CPA E/c görbéi;



3. a CHA N és CHA X csoportok CHA E/c görbéi;
4. a P7 csoport két adenzin E/c görbéje.

Az illesztést megosztott  $E_m$ ,  $K_A$  és  $n_{op}$  paraméterekkel végeztünk, csak a  $\tau$  lehetett eltérő (amely csökken sikeres receptor inaktiváció után). A kapott  $K_A$  értékeket – a meghatározás módjából adódóan – operatív  $K_A$ -nak neveztük.

Nemcsak a CPA, hanem a NECA és a CHA is lassan bomlik az élő szövetben (Mathôt és mtsai, 1993; Pavan és IJerman, 1998), ezért mindhárom szintetikus agonista kimosása hosszú idő, ami igénybe veszi a preparátumokat. A kísérlet rövidítése érdekében tehát az FSCPX előkezelést nem önkontrollal végeztük (hasonlóan a 2. protokollhoz). Ellensúlyozandó az emiatt nagyobb biológiai variabilitást, a NECA, CPA és CHA E/c görbék adatait az egyes csoportokon belül átlagoltuk és az átlagolt görbékre illesztettük az operatív modell egyenletét (12. egyenlet).

Az adenzint igen rövid féléletideje ( $\approx 10$  s) alkalmassá teszi önkontrollos E/c görbék felvételére, ezért a 7. protokoll során a 12. egyenletet nemcsak az átlagolt adenzin E/c görbepárokra illesztettük, hanem az azonos pitvaron felvett individuális adenzin E/c görbékre is (P7 Kontroll görbe és P7 FSCPX görbe).

### 3.6.2. A $K_A$ becslése Furchgott módszerével

A Furchgott módszerhez ugyanazon E/c görbék adatait dolgoztuk fel, mint az operatív módszerhez. A kivitelezést illetően kis módosításokkal Dennis és mtsai módszerét követtük (1992). Az átlagolt E/c görbék empirikus paraméterei ( $E_{max}$ ,  $EC_{50}$ ,  $n$ ) alapján a Hill egyenlet (3. egyenlet) segítségével kiszámoltuk a kiváltó koncentrációkat 12 általunk kiválasztott hatás értékhez: 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 92 (a CHA esetében az utolsó hatás értéket elhagytuk). Az azonos agonistához és azonos hatáshoz tartozó koncentrációkat párokba rendeztük, majd az intakt receptorokhoz kapcsolódó koncentrációkat ábrázoltuk a depletált receptorállományhoz tartozó koncentrációk logaritmusának függvényében. Az így kapott görbékre Furchgott egyenletét (13. egyenlet) illesztettük. A kapott  $K_A$  értékeket az operatív  $K_A$ -tól megkülönböztetendő Furchgott-féle  $K_A$ -nak neveztük.

### 3.7. A százalékos receptor okkupancia meghatározása

A százalékos hatás ( $E_{\%}$ ) a maximális hatás százalékában kifejezett hatás:

$$E_{\%} = \frac{E}{E_{\max}} \cdot 100\% \quad 17. \text{ egyenlet}$$

A hagyományos receptorelmélet szerint az agonistát kötött receptorok százaléka (százalékos okkupancia) az agonista koncentrációjától és az adott receptorhoz való affinitásától függ (Clark, 1926):

$$\rho_{\%} = \frac{c}{c + K_A} \cdot 100\% \quad 18. \text{ egyenlet}$$

ahol:  $c$  – az agonista koncentrációja;  $K_A$  – az agonista-receptor komplex egyensúlyi disszociációs konstansa (az 50%-os okkupanciát létrehozó agonista koncentráció);  $\rho_{\%}$  – a százalékos okkupancia.

A 3. és a 18. egyenletből kifejezhető a százalékos okkupancia és a hatás (illetve a százalékos hatás) kapcsolata:

$$\rho_{\%} = \frac{1}{\frac{K_A}{EC_{50}} \cdot \left( \frac{E_{\max}}{E} - 1 \right)^{\frac{1}{n}} + 1} \cdot 100\% \quad 19. \text{ egyenlet}$$

A 19. egyenletben szereplő hatás ( $E$ ) nem mért érték, hanem a kérdéses  $E/c$  görbe empirikus paramétereiből számoltuk a Hill egyenlettel (3. egyenlet). Ily módon az  $E$  – és vele a  $\rho_{\%}$  is – tetszőleges agonista koncentrációra meghatározható. A 19. egyenlet segítségével megszerkesztettük a NECA, a CPA és a CHA százalékos okkupancia - százalékos hatás görbéjét mind az operatív, mind a Furchgott-féle  $K_A$  értékek alapján.

### 3.8. A receptor rezerv kvantifikálása

A receptor rezervet egyrészt a PSR-rel ( $K_A/EC_{50}$ ) jellemeztük (Ruffolo, 1982), másrészt kifejeztük százalékos formában is ( $RR_{\%}$ ), a százalékos hatás (17. egyenlet) és a százalékos receptor okkupancia (19. egyenlet) különbségeként (Kenakin, 1987):

$$RR_{\%} = E_{\%} - \rho_{\%} \quad 20. \text{ egyenlet}$$

A 20. egyenlet felhasználásával meghatároztuk a százalékos receptor rezervet a NECA, a CPA és a CHA esetében mind az operatív, mind a Furchgott-féle  $K_A$  értékekből. A százalékos receptor rezervet végül a százalékos hatás függvényében ábrázoltuk mindhárom agonista esetén.

### 3.9. A CPA koncentráció-hatás görbék NBTI okozta torzulásának kvantifikálása

A nukleozid transzport gátlása emeli az endogén adenzin interstitialis koncentrációját metabolikusan intakt tengerimalac pitvarban (Karsai és mtsai, 2006, 2007). Ha egy exogén adenzin receptor agonista nukleozid transzport gátló jelenlétében kifejtett hatását úgy vizsgáljuk, hogy figyelmen kívül hagyjuk az interstitialis adenzin koncentrációjának változását, félrevezető eredményre jutunk (Gesztelyi és mtsai, 2004; Karsai és mtsai, 2006; Greczer és mtsai, 2010a). Ez a „figyelmen kívül hagyás” a jelen vizsgálatok során akkor valósult meg, amikor az NBTI jelenlétében felvett E/c görbék hatás értékeinek kiszámolásához csak a 16. egyenletet használtuk fel. Ennek megfelelően az NBTI jelenlétében felvett és konvencionálisan számolt hatás értékekkel ábrázolt E/c görbéinket torzultnak tekintettük, ahol is a torzító agonista koncentráció (ld.: 15. egyenlet) az endogén adenzin nukleozid transzport gátló hatására kialakult interstitialis koncentráció-növekménye ( $c_{\text{bias}}$ ).

Mivel a CPA lassan eliminálódik az általunk használt kísérleti rendszerből (Pavan és IJerman, 1998; Gesztelyi, 2004), a CPA pitvari sejtekbe való felvételének NBTI általi gátlása feltételezésünk szerint nem növeli számottevően a CPA koncentrációját az  $A_1$

receptorok sejtfelszíni kötőhelyének környezetében. Emiatt a natív és NBTI jelenlétében felvett CPA E/c görbék közötti különbség oka döntően az a hatás, melyet az endogén adenzin interstitialis koncentráció-többlete fejt ki (Karsai és mtsai, 2006). Ebből kiindulva az NBTI hatására felhalmozódott interstitialis adenzint az ekvielektív CPA koncentrációval ( $c_x$ ) kvantifikáltuk oly módon, hogy az RRM egyenletét (15. egyenlet) a P9 NBTI csoport átlagolt CPA E/c görbéjére illesztettük. Az illesztett egyenlet a P9 Kontroll csoport átlagolt CPA E/c görbéjének empirikus paramétereit tartalmazta (mint a torzítatlan állapotot leíró jellemzőket).

### 3.10. Az NBTI jelenlétében felvett adenzin koncentráció-hatás görbék hatás értékeinek korrekciója

Amikor egy szövet válaszát egy agonista koncentrációra torzítva észleljük egy másik, egyidejűleg ható agonista koncentráció figyelmen kívül hagyása miatt, a torzulás nagysága annak a hatásnak a nagyságától függ, amelyet a figyelmen kívül hagyott agonista koncentráció fejt ki (és amit szintén nem vettünk figyelembe; ld.: 14. egyenlet). Feltételeztük, hogy az NBTI ugyanakkora interstitialis adenzin koncentráció-növekedést okozott minden pitvarban, akár adenzin, akár CPA E/c görbét vettünk fel rajta a későbbiekben. Ebből kiindulva a torzult adenzin E/c görbékhez tartozó  $E_{bias}$  ( $= E_x$ ) értékek kiszámítása a 9. protokoll átlagolt CPA E/c görbéi alapján meghatározott  $c_x$  értékből történt.

Feltételeztük azt is, hogy az endogén adenzin NBTI okozta interstitialis koncentráció-növekedése ugyanakkora az intakt és az FSCPX-előkezelt pitvarokon. Ez alapján a 9. protokoll intakt pitvarain meghatározott  $c_x$ -et használtuk fel mind a P8 NBTI görbe, mind a P8 FSCPX+NBTI görbe transzformációjához. Figyelembe kellett azonban venni, hogy a  $c_x$  (pontosabban az ekvielektív  $c_{bias}$ ) más hatást képes kifejteni az intakt  $A_1$  receptorokon, mint az FSCPX által depletált  $A_1$  receptor populáción. Ezért meghatároztuk a CPA E/c összefüggését FSCPX-előkezelt pitvarokon is (P6 FSCPX csoport), amely alapján kiszámolható a  $c_x$  hatása a depletált  $A_1$  receptorkészletű pitvarokon. (Ezzel pedig azt feltételeztük, hogy ha egy adenzin és egy CPA koncentráció ekvielektívek intakt pitvaron, akkor ekvielektívek depletált  $A_1$  receptorállományú pitvaron is.)

Az  $E_{bias}$  értékeket a Hill egyenlet segítségével számoltuk ki:

$$E_{bias} = E_x = E_{max} \cdot \frac{c_x^n}{c_x^n + EC_{50}^n} \quad 21. \text{ egyenlet}$$

ahol:  $E_{bias}$  – az a hatás, amelyet az NBTI jelenlétében interstitialisan felhalmozódott extra mennyiségű endogén adenzin hoz létre (míg  $E_x$  definíciószerűen a  $c_x$ -ből számolható hatás);  $c_x$  – a 15. egyenlettel meghatározott teoretikus CPA koncentráció, amely ekvieffektív az NBTI által akkumulált interstitialis adenzin többlettel;  $E_{max}$ ,  $EC_{50}$ ,  $n$  – a P9 Kontroll csoport vagy a P6 FSCPX csoport átlagolt CPA E/c görbéjének empirikus paraméterei (ld. később).

Amikor az  $E_{bias}$  értékét az átlagolt P8 NBTI görbe korrekciójához számoltuk ki, a P9 Kontroll csoport átlagolt CPA E/c görbéjének empirikus paramétereit helyettesítettük be a 21. egyenletbe. Amikor az  $E_{bias}$ -t az átlagolt P8 FSCPX+NBTI görbe korrekciójához határoztuk meg, a P6 FSCPX csoport átlagolt CPA E/c görbéjének empirikus paramétereit írtuk be a 21. egyenletbe.

A torzult hatásokból és a hozzájuk tartozó  $E_{bias}$  értékből a korrigált hatásokat a 14. egyenlet átrendezett formájával számoltuk ki:

$$E = 100 - \frac{(100 - E') \cdot (100 - E_{bias})}{100} \quad 22. \text{ egyenlet}$$

ahol:  $E$  - az átlagolt P8 NBTI vagy P8 FSCPX+NBTI görbéhez tartozó korrigált hatás érték;  $E'$  – az átlagolt P8 NBTI vagy P8 FSCPX+NBTI görbe konvencionálisan számolt hatás értéke, amelyet torzultnak tekintettünk;  $E_{bias}$  – az NBTI okozta interstitialis adenzin többlet hatása az intakt vagy depletált  $A_1$  receptor populációjú pitvarokon (az előbbi említések sorrendjében).

A 22. egyenlet segítségével kapott korrigált hatás értékek mind az endogén adenzin többletet, mind az exogén adenzint figyelembe veszik. Ez lehetővé teszi, hogy az NBTI hatását az adenzin E/c görbékre az extracellulárisan felhalmozódó endogén adenzin okozta torzulás nélkül vizsgáljuk.

### 3.11. Adatelemzés

Minden pitvar esetében három kritériumnak kellett teljesülnie ahhoz, hogy bekerüljön a statisztikai elemzésbe (ugyanakkor minden olyan pitvar adatait feldolgoztunk, amely megfelelt a három kritériumnak):

1. a nyugalmi kontrakciós erőnek az első E/c görbe felvétele előtt el kellett érnie az 1 mN-t;
2. a pitvarnak szabályosan (az ingerlés frekvenciájával) kellett összehúzódnia;
3. az első adenozin E/c görbe  $EC_{50}$  értékéhez legközelebb eső adenozin koncentrációra adott válasznak a számtani közép  $\pm 2$  SD intervallumon belül kellett lennie. Az átlagot és az SD-t az oldószer- és a tiroxin-kezelt pitvarokra külön határoztuk meg (azokra a pitvarokra, amelyekre az első két kritérium teljesült). Az  $EC_{50}$ -hez legközelebb eső adenozin koncentrációk 10  $\mu$ M illetve 100  $\mu$ M voltak az oldószer- illetve tiroxin-kezelt pitvarokon (az említés sorrendjében).

Két adathalmazt, ha mindkettő normál eloszlású volt és a varianciáik is homogénnek bizonyultak, párosított vagy párosítatlan Student-féle t-próbával hasonlítottunk össze. Ha csak a normalitás vizsgálaton feleltek meg, Welch által korrigált t-próbát használtunk. Három vagy több adathalmaz összehasonlítását Newman-Keuls post-tesztel kombinált egyszempontú varianciaanalízissel (one-way ANOVA) vagy ismételt mérések egyszempontú varianciaanalízissel (repeated-measures one-way ANOVA) végeztük, ha minden adathalmaz átment a normalitás vizsgálaton és a varianciák homogenitásának vizsgálatán. Ha bármelyik akár az egyik teszten is megbukott, Dunn poszt-teszttel kombinált Kruskal-Wallis próbát használtunk. A csoportok középértékeinek különbségét  $p < 0.05$  esetén tekintettük szignifikánsnak. Az adatokat általában számtani közép  $\pm$  SEM formában közöltük.

Olyan függvények esetében, amelyeken görbeillesztést végeztünk, az x tengelyen az adott mennyiség tízes alapú logaritmusát ábrázoltuk (ezzel összhangban az x mennyiség az illesztett egyenletben is logaritmikus formában szerepelt). Azokat a paramétereket, amelyeknek a logaritmusa követ normál eloszlást ( $EC_{50}$ ,  $K_A$ ,  $\tau$ ,  $c_x$ ,  $A_2$ ), úgy illesztettük, hogy az egyenletben a logaritmusukat szerepeltettük (pl.  $EC_{50}^n$  helyett  $10^{n \cdot \log EC_{50}}$ ). Ez azért fontos, hogy a regressziós paraméterhez korrekt konfidencia intervallumot kapjunk (Motulsky és Christopoulos, 2004). A görbeillesztés precizitását és ezáltal az eredmények

megbízhatóságát a regressziós paraméterek 95%-os konfidencia intervallumával jellemeztük.

A statisztikai elemzéshez és a görbeillesztéshez a GraphPad Prism 4.03 for Windows szoftvert használtuk. A többi számítást Microsoft Office Excel 2003 vagy 2010 szoftverrel végeztük.

## 4. Eredmények

### 4.1. Az A<sub>1</sub> adenosin receptor CPX iránti affinitásának változása 8 napos tiroxin-kezelés után

#### 4.1.1. A tiroxin-kezelés hatása a tengerimalacok testtömegére

A tiroxin-kezelt tengerimalacok kiindulási testtömege nem különbözött szignifikánsan az oldószer-kezeltekétől. A tiroxin-kezelés 9. napjára az oldószer-kezelt állatok testtömege (átlag  $\pm$  SEM) 854  $\pm$  21 g-ról 861  $\pm$  23 g-ra változott (nem szignifikáns), míg tiroxin-kezelteké 887  $\pm$  19 g-ról 687  $\pm$  14 g-ra csökkent ( $p < 0.0001$ ).

#### 4.1.2. Az A<sub>1</sub> adenosin receptor affinitás változása adenzinnal vizsgálva

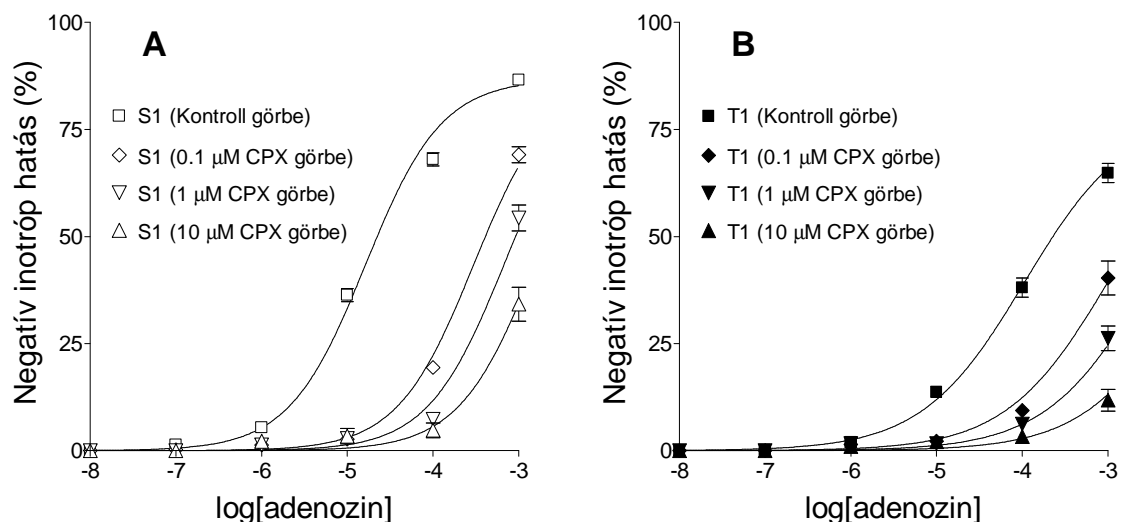
Az adenosin koncentrációfüggően csökkentette a pitvarok kontrakciós erejét, a CPX pedig koncentrációfüggően gátolta az adenosin hatását mind oldószer-, mind tiroxin-kezelés után (11. ábra).

Az S1 csoport és a T1 csoport összehasonlítása alapján a tiroxin-kezelés csökkentette a pitvarok E/c görbéinek E<sub>max</sub>-át (89.74  $\pm$  1.23% vs. 82.94  $\pm$  2.93%; nem-szignifikáns), növelte a logEC<sub>50</sub>-ét (-4.72  $\pm$  0.05 vs. -3.88  $\pm$  0.1;  $p < 0.0001$ ) és csökkentette a Hill koefficiensét (0.81  $\pm$  0.04 vs. 0.7  $\pm$  0.04; nem-szignifikáns).

Az összetartozó E/c görbék illesztése során a variábilis Schild koefficiensű modell illeszkedése szignifikánsan jobb volt, mint az egységnyi Schild koefficiensű modellté, mind az oldószer-, mind a tiroxin-kezelt pitvarok esetében. Ebből következően a CPX létrehozta gátlást az adenosin negatív inotróp hatásával szemben csak pA<sub>2</sub> értékkel (és nem pK<sub>B</sub>-vel) tudtuk jellemezni (1. táblázat). Az oldószer-kezelt pitvarokhoz tartozó pA<sub>2</sub> figyelemre méltóan nagyobb volt, mint a tiroxin-kezelt pitvarok pA<sub>2</sub> értéke, miközben a 95%-os konfidencia intervallumok nem mutattak átfedést egymással (1. táblázat). Ez azt mutatja,



hogy a CPX (ugyanakkora koncentrációban alkalmazva) erősebb gátlást hozott létre az euthyreoid pitvarokon, mint a hyperthyreoidokon.

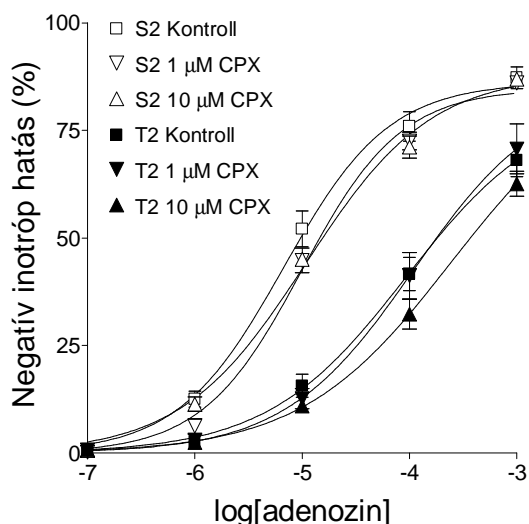


**11. ábra.** Az adenoszin hatása a kontrakciós erőre oldószer- (A) és tiroxin-kezelt (B) tengerimalacok izolált bal pitvarán 0 (kontroll), 0,1, 1 és 10  $\mu\text{M}$  CPX jelenlétében. Az x tengely az adenoszin moláris koncentrációjának tízes alapú logaritmusát mutatja, míg az y tengely a pitvarok kontrakciós erejének csökkenését a kiindulási érték százalékában. A szimbólumok az egyes koncentrációkra adott válaszok csoportátlagát jelzik ( $\pm$  SEM), a görbék pedig a rájuk globálisan illesztett Schild egyenletet (variábilis Schild koefficiens mellett).

#### 4.1.3. Az $A_1$ adenoszin receptor affinitás változása CPA-val vizsgálva

Az adenoszin koncentrációfüggően gyengítette a 2. protokollban szereplő pitvarok kontrakciós erejét is (12. ábra).

Az azonos *in vivo* kezelésű csoportok egyesített adatait összehasonlítva (S2 vs. T2) a tiroxin-kezelés csökkentette az  $E_{\text{max}}$ -ot ( $86.51 \pm 1.38\%$  vs.  $80.98 \pm 3.15\%$ ; nem-szignifikáns), növelte a  $\log EC_{50}$ -et ( $-5.06 \pm 0.05$  vs.  $-3.88 \pm 0.1$ ;  $p < 0.0001$ ), valamint csökkentette a Hill koefficiensét ( $0.88 \pm 0.04$  vs.  $0.7 \pm 0.04$ ;  $p = 0.0044$ ). Ezzel szemben az azonos *in vivo* kezelésű csoportokon belül végezve az összehasonlítást azt kaptuk, hogy nincs szignifikáns eltérés egy Hill paraméter esetében sem, tehát az azonos *in vivo* kezelésű állatok pitvarai homogén populációt képeztek az adenoszinra adott válasza nézve (12. ábra).



**12. ábra.** Az adenosin hatása a kontrakciós erőre oldószer- (üres szimbólumok) és tiroxin-kezelt (teli szimbólumok) pitvarokon. Az ábra a 2. protokoll szerinti CPX-kezelés előtti állapotot mutatja minden csoport esetében. Az x tengely az adenosin moláris koncentrációjának tízes alapú logaritmusát mutatja, míg az y tengely a kontrakciós erő csökkenését a kiindulási érték százalékában. A szimbólumok az egyes koncentrációkra adott válaszok csoportátlagát jelzik ( $\pm$  SEM), a görbék pedig a rájuk illesztett Hill egyenletet.

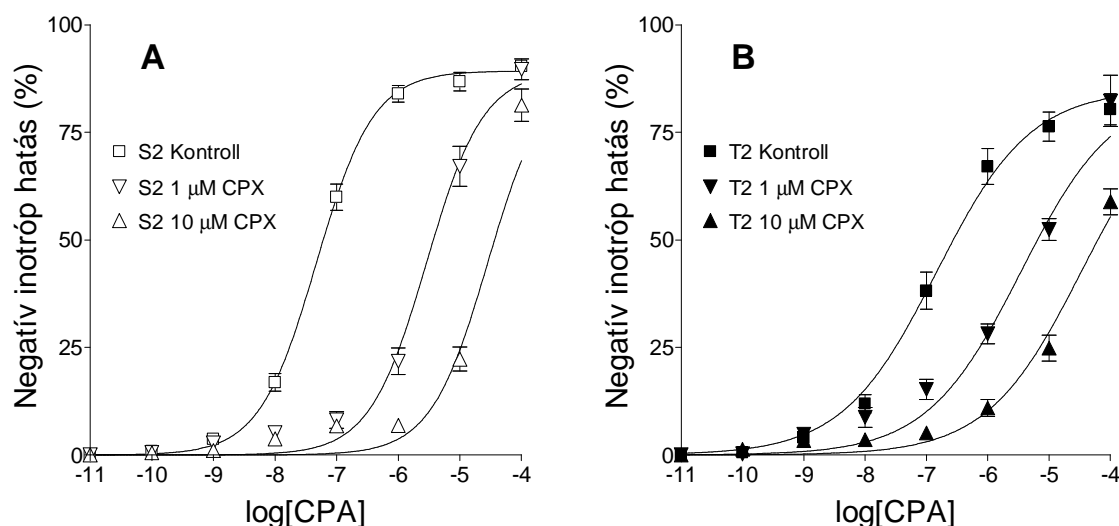
pedig a rájuk illesztett Hill egyenletet.

	ADENOZIN		CPA	
	oldószer	tiroxin	oldószer	tiroxin
<b>pA<sub>2</sub></b>	<b>10.37</b>	<b>8.84</b>	7.96	7.2
<b>95% CI</b>	<b>9.8 – 10.93</b>	<b>8.35 – 9.33</b>	7.61 – 8.3	6.86 – 7.54
<b>Schild k.</b>	<b>0.37</b>	<b>0.5</b>	0.92	1.09
<b>pK<sub>B</sub></b>	7.77	7.66	<b>7.78</b>	<b>7.36</b>
<b>95% CI</b>	7.64 – 7.9	7.53 – 7.79	<b>7.69 – 7.87</b>	<b>7.2 – 7.51</b>
<b>K<sub>B</sub> (nM)</b>			<b>16.63</b>	<b>44.16</b>

**1. táblázat.** A szelektív A<sub>1</sub> receptor antagonistá CPX hatása az adenosin és a CPA kiváltotta negatív inotrópiára izolált, ingerelt oldószer- illetve tiroxin-kezelt tengerimalac bal pitvaron. A kapott értékeket az összetartozó (csoporton belül átlagolt) E/c görbékre globálisan illesztett Schild egyenlet szolgáltatta. Variábilis Schild koefficiens mellett a CPX hatását a pA<sub>2</sub> jellemzi, míg S=1 esetén a pK<sub>B</sub>. A félkövér számok a preferálandó értékeket mutatják, a dőlt számok az elvetendőket. pA<sub>2</sub> – a kontroll EC<sub>50</sub> értéket megkétszerező antagonistá koncentráció negatív tízes alapú logaritmusá; pK<sub>B</sub> – a CPX - A<sub>1</sub> receptor komplex ekvilibrium disszociációs konstansának negatív tízes alapú logaritmusá; Schild k. – Schild koefficiens; 95% CI – 95%-os konfidencia intervallum.

Az adenosinhoz hasonlóan a CPA is koncentrációfüggően gyengítette a pitvarok kontrakciós erejét, a CPX pedig koncentrációfüggően gátolta a CPA által kifejtett hatást mind oldószer-, mind tiroxin-kezelés után (13. ábra).

Az S2 Kontroll és T2 Kontroll csoportok összehasonlítása alapján a tiroxin-kezelés csökkentette az  $E_{\max}$ -ot ( $88 \pm 2.02\%$  vs.  $81.64 \pm 2.72\%$ ; nem-szignifikáns), növelte a  $\log EC_{50}$ -et ( $-7.36 \pm 0.06$  vs.  $-6.9 \pm 0.1$ ;  $p = 0.001$ ) és csökkentette a Hill koefficienszt ( $0.98 \pm 0.04$  vs.  $0.74 \pm 0.05$ ;  $p = 0.0016$ ).



**13. ábra.** A CPA hatása a kontrakciós erőre oldószer- (A) és tiroxin-kezelt (B) pitvarokon 0 (kontroll), 1 és 10  $\mu\text{M}$  CPX jelenlétében. Az x tengely az adenzin moláris koncentrációjának tízes alapú logaritmusát mutatja, míg az y tengely a pitvarok kontrakciós erejének csökkenését a kiindulási erő százalékában. A szimbólumok az egyes koncentrációkra adott válaszok csoportátlagát jelzik ( $\pm$  SEM), a görbék pedig a rájuk globálisan illesztett Schild egyenletet mutatják egységnyi Schild koefficiens esetén ( $S=1$ ).

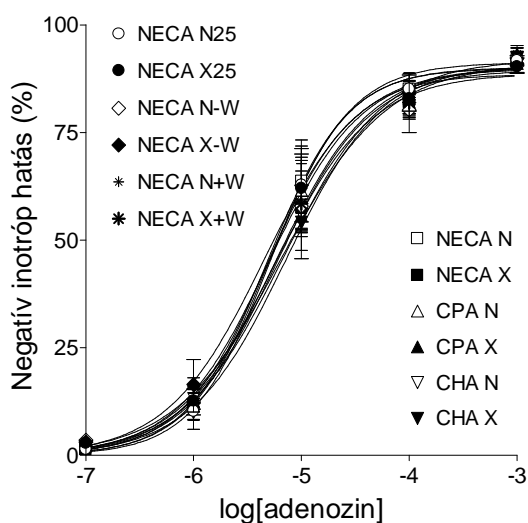
Szemben az 1. protokoll kísérleteivel (ahol adenzin volt az agonista), a CPA-val felvett összetartozó E/c görbékre az egységnyi Schild koefficiensű modell illeszkedett szignifikánsan jobban mind az oldószer-, mind a tiroxin-kezelt pitvarok esetében. A CPX okozta gátlás tehát a 2. protokoll CPA E/c görbéinél jellemezhető a  $pK_B$  értékkel (1. táblázat). Az oldószer-kezelt pitvarokhoz tartozó  $pK_B$  nagyobb volt, mint a tiroxin-kezelt pitvarokra meghatározott  $pK_B$ , emellett a 95%-os konfidencia intervallumok nem fedtek át egymással (1. táblázat). Ez azt jelenti, hogy a CPX-nek kisebb az affinitása a hyperthyreoid tengerimalacok pitvari  $A_1$  receptorához, mint az euthyreoidokéhoz. Mivel a  $pK_B$  tisztán az antagonisták és a receptor kölcsönhatását jellemzi (függetlenül a mért hatás jellegétől és a funkcionális assay-hez használt agonista tulajdonságaitól), a kapott  $pK_B$  értékek különbsége

az eu- és hyperthyreoid tengerimalac pitvari A<sub>1</sub> receptorok ortoszterikus kötőhelyének eltérő szerkezetére utal.

## 4.2. A pitvari direkt negatív inotrópia A<sub>1</sub> adenzin receptor rezervje

### 4.2.1. A 3., 4., 5. protokollhoz és a 6. protokoll eredeti hat csoportjához tartozó pitvarok adenzin-érzékenysége

A 3., 4. és 5. protokoll valamint a 6. protokoll eredeti hat csoportjának adenzin E/c görbéi nem különböztek szignifikánsan egymástól, a hozzájuk tartozó pitvarok tehát homogén populációt képeztek (14. ábra).



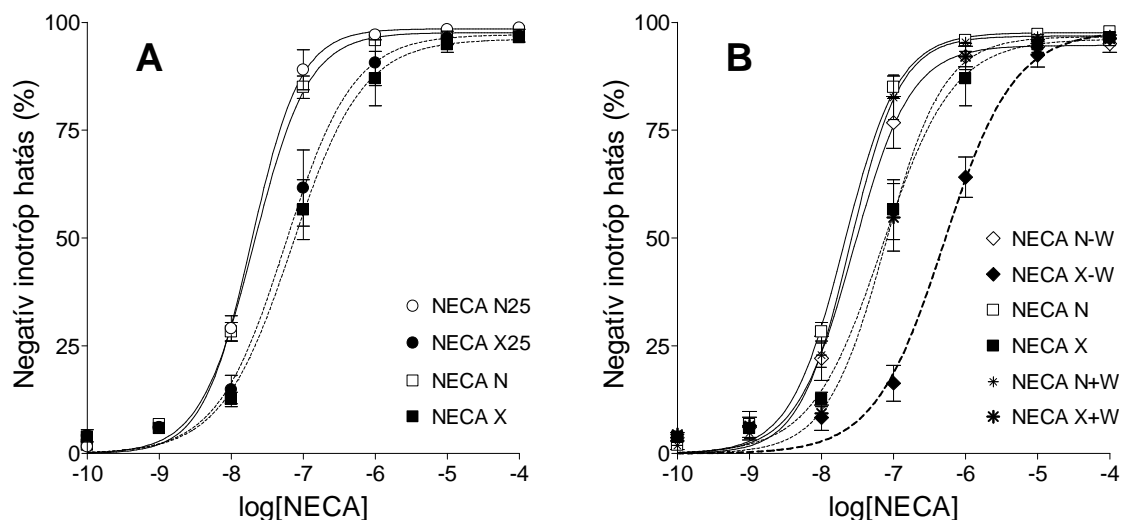
**14. ábra.** A 3., 4., 5. protokollhoz és a 6. protokoll eredeti hat csoportjához tartozó pitvarok adenzinra adott direkt negatív inotróp válasza. Az x tengely az adenzin moláris koncentrációjának tízes alapú logaritmusát mutatja, az y tengely pedig a pitvarok kontrakciós erejének csökkenését a kiindulási érték százalékában. A szimbólumok az egyes koncentrációkra adott válaszok csoportátlagát jelzik ( $\pm$  SEM), a görbék pedig a rájuk illesztett Hill egyenletet. A pitvarok itt még valamennyien

natív A<sub>1</sub> adenzin receptor populációjúak. Az N jelzésű csoportok a későbbiekben *in vitro* oldószer, míg az X jelzésűek *in vitro* FSCPX előkezelést kaptak.

### 4.2.2. Az FSCPX viselkedése izolált pitvaron

A 3., 4., 5. és 6. protokoll kontroll (N jelzésű) NECA E/c görbéi nem különböztek szignifikánsan egymástól. A szelektív és irreverzibilis A<sub>1</sub> receptor antagonistá FSCPX az

összes protokoll esetében (X jelzésű csoportok) gátolta a NECA hatását (jobbra tolta a E/c görbéket) (15. ábra).



**15. ábra.** A 3., 4., 5. és 6. protokoll hatása a NECA kiváltotta direkt negatív inotrópiára. Az x tengely a NECA moláris koncentrációjának tízes alapú logaritmusát mutatja, az y tengely pedig a pitvarok kontrakciós erejének csökkenését a kiindulási érték százalékában. A szimbólumok az egyes koncentrációkra adott válaszok csoportátlagát jelzik ( $\pm$  SEM), a görbék pedig a rájuk illesztett Hill egyenletet. Az N jelzés a csoportnévben (és a folyamatos vonal) az *in vitro* FSCPX előkezelés hiányát jelenti, míg az X jelzés a csoportnévben (és a pontozott vonal) az *in vitro* FSCPX előkezelést mutatja. A NECA X-W csoport (vastag pontozott vonal) annyiban kivételes, hogy ott az FSCPX végig jelen volt a E/c görbe felvétele folyamán.

A 10  $\mu$ M FSCPX inkubációs idejének 25 percről 45 percre való növelése (NECA X25 vs. NECA X) csak kismértékben (és statisztikailag nem-szignifikáns módon) csökkentette a NECA negatív inotróp hatását (15. A ábra). Ebből következően nem volt okunk tovább növelni az FSCPX inkubációs idejét.

A 10  $\mu$ M FSCPX kimosás nélkül (NECA X-W) szignifikánsan növelte a NECA logEC<sub>50</sub>-ét az összes többi NECA csoporthoz képest (beleértve saját kontrollját, a NECA N-W csoportot is) (15. B ábra). Ez arra vezethető vissza, hogy a feleslegben adott (vagyis az A<sub>1</sub> receptorokhoz irreverzibilisen nem kapcsolódott) FSCPX kompetitíven antagonizálja a NECA hatását a nem inaktivált receptorokon. Ezért lényeges, hogy az irreverzibilisen nem kötődött FSCPX frakció ugyanolyan jól kimosódott 75 perc alatt, mint 120 perc alatt

(NECA X vs. NECA X+W; 15. B ábra). Vagyis, a 75 perces mosási idő elegendő a felesleges FSCPX eltávolításához.

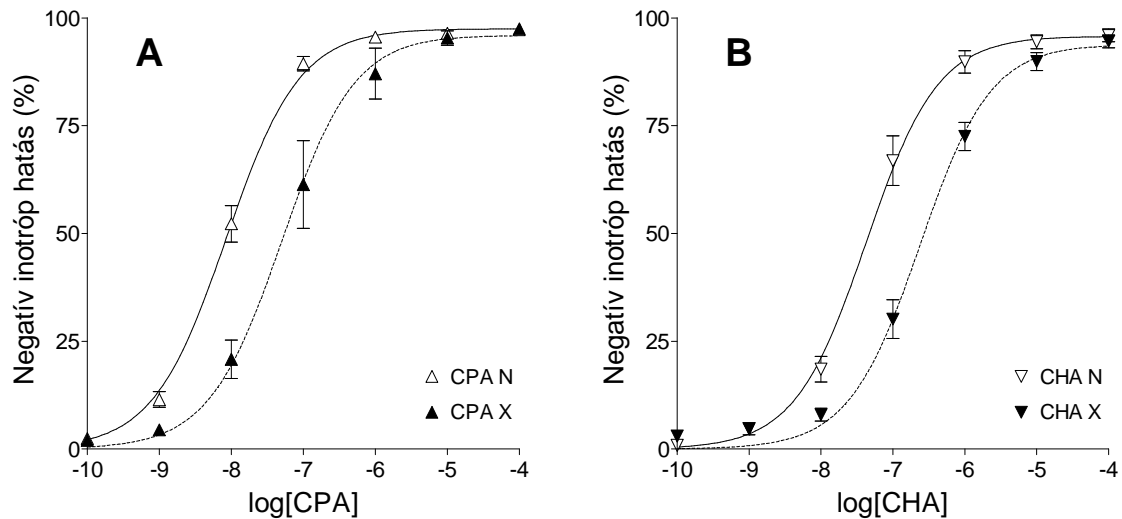
#### 4.2.3. Az A<sub>1</sub> adenozin receptor rezerv a szintetikus agonisták direkt negatív inotróp hatására nézve

*Kontroll E/c görbék:* A három szintetikus agonista E/c görbéi csak a logEC<sub>50</sub> értékben különböztek egymástól az N jelzésű csoportok között (2. táblázat).

	NECA N	CPA N	CHA N
<b>E<sub>max</sub> (%)</b>	97.76 ± 0.48	96.81 ± 0.93	95.35 ± 1.52
<b>logEC<sub>50</sub></b>	-7.68 ± 0.04	-8.09 ± 0.07 # #	-7.37 ± 0.1 +; ***
<b>n</b>	1.19 ± 0.07	1.01 ± 0.04	1 ± 0.03

**2. táblázat.** A NECA, CPA és CHA direkt negatív inotróp hatása a 6. protokoll intakt A<sub>1</sub> receptorállományú pitvaraira. Az E<sub>max</sub>, EC<sub>50</sub> és n értékek az egyedi E/c görbék Hill egyenlettel való illesztése során kapott regressziós paraméterek csoportátlagai (± SEM). A statisztikai szignifikancia mértékét jeleztük (#: NECA N vs. CPA N; +: NECA N vs. CHA N; \*: CPA N vs. CHA N).

*Az FSCPX hatása:* Az FSCPX előkezelés szignifikánsan növelte minden agonista E/c görbéjének logEC<sub>50</sub>-ét, ugyanakkor lényegében változatlanul hagyta az E<sub>max</sub> és az n paramétereket a nekik megfelelő kontroll görbékhez képest. Az FSCPX tehát jobbra tolta a E/c görbéket, ami a kompetitív antagonizmus képét utánozza (15., 16. ábra). Ez azt jelenti, hogy még a 45 perces inkubáció 10 μM FSCPX-szel sem tudott akkora A<sub>1</sub> receptor frakciót inaktíválni, ami elegendő lenne a pitvari direkt negatív inotróp hatás E<sub>max</sub>-ának szignifikáns csökkentéséhez.



**16. ábra.** Az FSCPX előkezelés hatása a CPA (**A** panel) és a CHA (**B** panel) kiváltotta direkt negatív inotrópiára izolált tengerimalac bal pitvaron. Az x tengely az agonista moláris koncentrációjának tízes alapú logaritmusát mutatja, az y tengely pedig a pitvarok kontrakciós erejének százalékos csökkenését a kiindulási értékhez képest. A szimbólumok az egyes koncentrációkra adott válaszok csoportátlagát jelzik ( $\pm$  SEM), míg a görbék az illesztett Hill egyenletet mutatják. A csoportok nevében az N (és a folytonos vonal) az intakt  $A_1$  adenzin receptor populációjú állapotot jelenti, míg az X (és a pontozott vonal) az FSCPX által depletált  $A_1$  adenzin receptorkészletet jelzi.

*Az operatív  $K_A$  meghatározása:* Az operatív modell egyenletének (12. egyenlet) illesztésével kapott  $E_m$  értékek szűk tartományban, 96 és 100% között mozogtak, 95%-os konfidencia intervallumaik is jelentős átfedést mutattak (3. táblázat). Az agonisták affinitási sorrendje: NECA > CPA > CHA volt. Az operatív efficacy sorrendje (az N jelű csoportokat véve figyelembe) a következőképpen alakult: CPA > CHA > NECA (3. táblázat).

*A Furchgott-féle  $K_A$  meghatározása:* A 13. egyenlet illesztésekor a szigmoid lefutású függvénynek csak az alsó görbületét kaptuk meg. Ez azzal függ össze, hogy nem sikerült kellően csökkenteni az FSCPX-előkezelte pitvarok E/c görbéinek  $E_{max}$ -át, így a szigmoid görbék felső görbülete lemaradt (17. ábra). A Furchgott-féle  $K_A$  értékek hasonlóak voltak az operatív  $K_A$  értékekhez, ennek megfelelően az affinitási sorrend is ugyanúgy alakult: NECA > CPA > CHA (4. táblázat). A q értékek alapján az  $A_1$  receptorok mintegy 80-90%-a inaktiválódott az FSCPX előkezelés következtében (4. táblázat).

	NECA N	NECA X	CPA N	CPA X	CHA N	CHA X
$E_m$ (%)	99.78		97.9		96.31	
95% CI	94.85 – 104.7		92.56 – 103.2		91.92 – 100.7	
$\log K_A$	-5.91		-5.3		-4.81	
95% CI	-6.54 – -5.28		-7.37 – -3.23		-6.2 – -3.41	
$K_A$ ( $\mu\text{M}$ )	1.22		5.01		15.63	
$\log \tau$	1.76	1.24	2.77	1.99	2.56	1.8
95% CI	1.09 – 2.42	0.64 – 1.84	0.64 – 4.89	-0.08 – 4.05	1.13 - 4	0.42 – 3.19
$\tau$	56.89	17.22	586.14	96.83	363.92	63.53
$n_{op}$	1.04		0.85		0.87	
95% CI	0.88 – 1.21		0.7 – 1		0.75 – 0.99	

**3. táblázat.** Az FSCPX hatása a NECA, CPA és CHA létrehozta direkt negatív inotrópiára az agonizmus operatív modellje alapján. Az  $E_m$ ,  $\log K_A$ ,  $\log \tau$  és  $n_{op}$  értékek a csoportonként átlagolt E/c görbék N-X párojaira illesztett 12. egyenlet regressziós paraméterei. 95% CI – a regressziós paraméterek 95%-os konfidencia intervalluma.

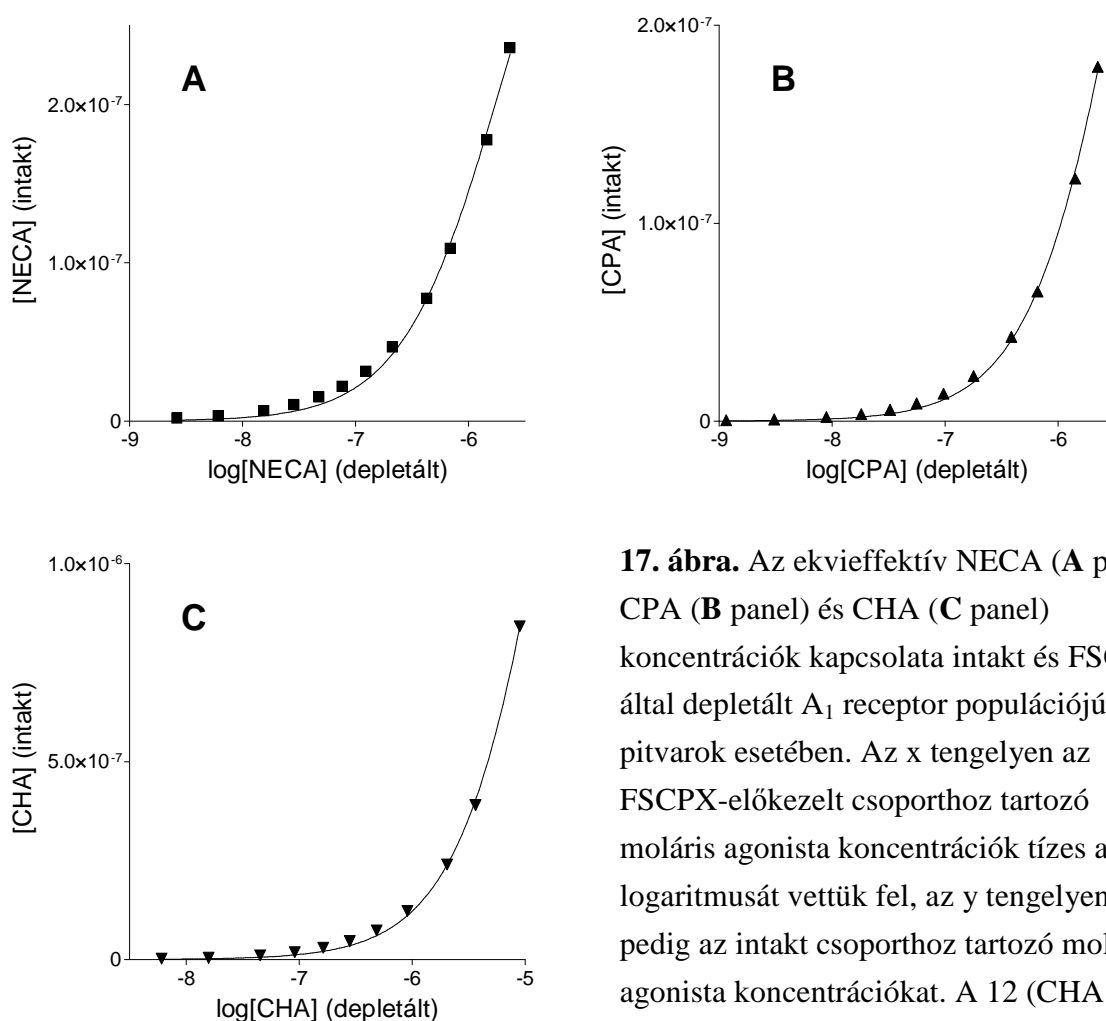
	NECA	CPA	CHA
$\log K_A$	-5.83	-5.35	-4.66
95% CI	-5.94 – -5.73	-5.49 – -5.21	-4.79 – -4.52
$K_A$ ( $\mu\text{M}$ )	1.47	4.49	22.13
$q$	0.22	0.11	0.13
95% CI	0.2 – 0.25	0.1 – 0.12	0.12 – 0.14

**4. táblázat.** Az FSCPX hatása a NECA, CPA és CHA kiváltotta direkt negatív inotrópiára Furchgott módszerével jellemezve. Az X jelű csoportokra vonatkozó  $q$  valamint az N és X jelű csoportokhoz egyaránt tartozó  $\log K_A$  értékeket a 13. egyenlet illesztésével kaptuk. 95% CI – a regressziós paraméterek 95%-os konfidencia intervalluma.

*A receptor okkupancia - hatás függvények megszerkesztése:* A NECA, CPA és CHA E/c görbék empirikus adatai, továbbá az operatív és a Furchgott-féle  $K_A$  értékek



felhasználásával megszerkesztett  $\rho\%$  -  $E\%$  görbék mindhárom agonista esetében nagyfokú jelerősítést mutatnak a pitvari  $A_1$  receptor direkt negatív inotróp működésében (18. ábra). Például 1%-os receptor okkupancia, ami erősítés nélkül 1%-os hatást okozna, NECA, CPA illetve CHA alkalmazásakor a maximális hatás 35.5, 84.7 illetve 77.9%-át váltotta ki az operatív  $K_A$  alapján, valamint a maximális hatás 40.4, 83.3 illetve 83.1%-át a Furchgott-féle  $K_A$ -ból számolva.

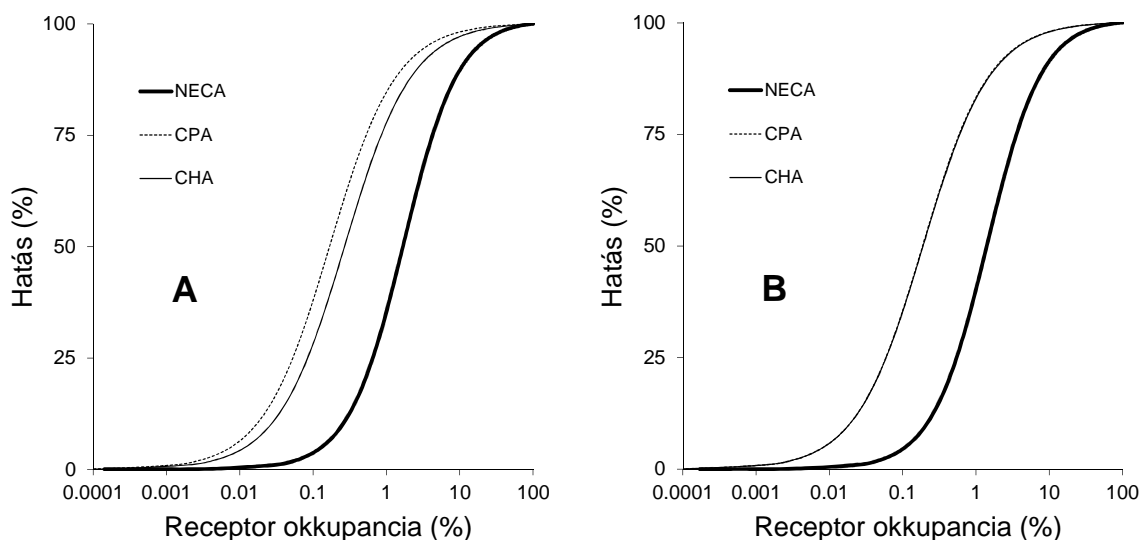


**17. ábra.** Az ekvieffektív NECA (A panel), CPA (B panel) és CHA (C panel) koncentrációk kapcsolata intakt és FSCPX által depletált  $A_1$  receptor populációjú pitvarok esetében. Az x tengelyen az FSCPX-előkezelt csoporthoz tartozó moláris agonista koncentrációk tízes alapú logaritmusát vettük fel, az y tengelyen pedig az intakt csoporthoz tartozó moláris agonista koncentrációkat. A 12 (CHA esetében 11) hatás értékhez tartozó

koncentrációkat a Hill egyenlettel számoltuk ki mind az intakt, mind az FSCPX-előkezelt pitvarok esetén. A szimbólumok azokat intakt csoportbeli agonista koncentrációkat mutatják, amelyek ekvieffektívek az FSCPX-előkezelt csoportok agonista koncentrációival. A görbék az illetett Furchgott modellt (13. egyenlet) illusztrálják.

*A receptor rezerv jellemzése PSR értékekkel:* A PSR értékek mindhárom agonista esetén lényegesen nagyobbak voltak, mint 1 (ami a minimális érték). Mindkét eredetű  $K_A$ -

ból kiindulva a NECA-hoz tartozott a legkisebb receptor rezerv, míg a CPA-hoz a legnagyobb: CPA > CHA > NECA (5. táblázat).



**18. ábra.** Az A<sub>1</sub> adenoszin receptor okkupancia és a direkt negatív inotróp hatás közötti kapcsolat a NECA, a CPA és a CHA esetében az operatív (A panel) illetve a Furchgott (B panel) modellel meghatározott K<sub>A</sub> értékekből számolva. Az x tengely a receptor okkupanciát mutatja a teljes receptorszám százalékában (logaritmikus léptékkel), az y tengely pedig a direkt negatív inotróp hatást tünteti fel a maximális hatás százalékában.

*A receptor rezerv jellemzése RR<sub>%</sub> értékekkel:* A másik mutató, a 20. egyenlet által definiált RR<sub>%</sub> alapján ugyanaz a sorrend állítható fel az agonisták receptor rezervére, mint a PSR szerint, mind az operatív, mind a Furchgott-féle K<sub>A</sub> értékek alapján. A RR<sub>%</sub>-et a E<sub>%</sub> függvényében ábrázolva látható, hogy a rezerv NECA esetében kb. 70%-os E<sub>%</sub>-ig, CPA és CHA esetében pedig kb. 90%-os hatásig igen szorosan megközelíti az elvileg elérhetetlen felső korlátot (az origóból induló 45°-os egyenest). A függvények azonban egy maximum elérése után meredeken lefelé kanyarodnak, majd végül a 100%-os E<sub>%</sub>-nál 0%-os receptor rezerv értéket vesznek fel (19. ábra). Minél meredekebben (közelebb a felső korláthoz) haladt fölfelé az elején egy agonista RR<sub>%</sub> függvénye, annál nagyobb volt a maximuma és ez a maximum annál nagyobb E<sub>%</sub>-nál alakult ki (5. táblázat).

Az FSCPX-előkezelt pitvarok görbeillesztéssel meghatározott E<sub>max</sub>-ában nem volt szignifikáns csökkenés a kontrollokhöz képest (15., 16. ábra). A 17. és 19. egyenlettel azonban kiszámolhatóak azok a E<sub>%</sub>-ok, amelyet a natív pitvarok produkálnak  $\rho_{\%} = q \cdot 100\%$

esetén, ami az FSCPX-előkezelt pitvarokon a nem inaktiválódott receptorok százaléka (tehát a  $\rho\%$  maximuma). Ezek az  $E\%$ -ok az FSCPX előkezelés után elérhető maximális hatást mutatják az intakt maximális hatás százalékában, melyek kisebbek, de alig kisebbek 100%-nál (6. táblázat).

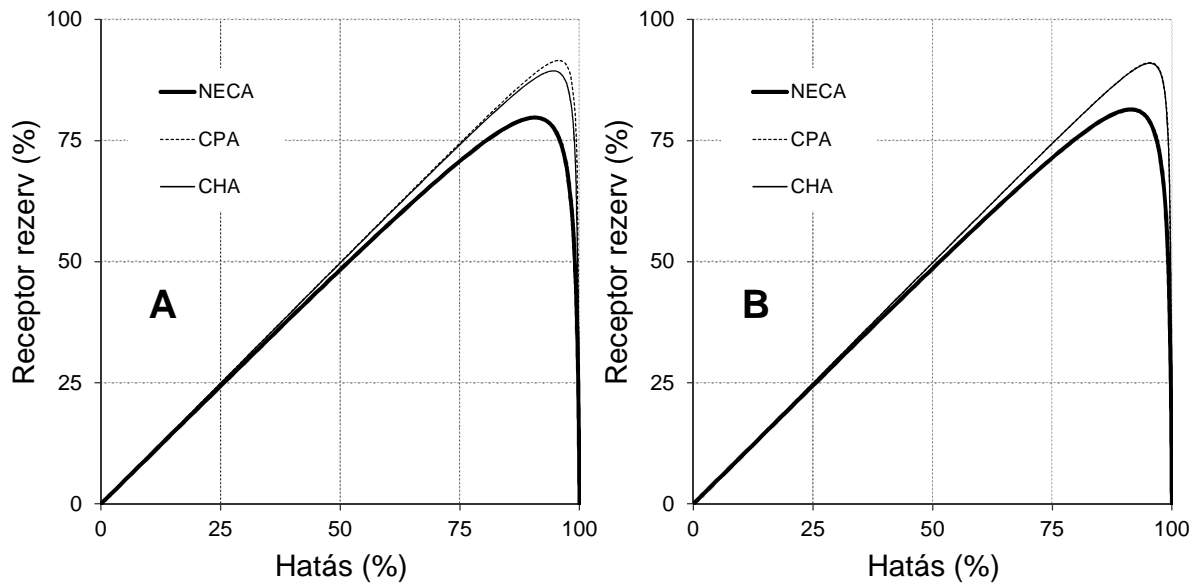
		PSR	RR <sub>%</sub> max	E <sub>%</sub>
<b>NECA</b>	op	58.9	79.8	90.7
	F	70.5	81.4	91.5
<b>CPA</b>	op	599	91.6	95.7
	F	536.3	91.1	95.4
<b>CHA</b>	op	374.1	89.4	94.6
	F	529.6	91	95.4

**5. táblázat.** A NECA, a CPA és a CHA által az A<sub>1</sub> adozin receptoron kiváltott direkt negatív inotróp hatás százalékos receptor rezerv izolált tengerimalac bal pitvaron. PSR – pharmacological shift ratio ( $K_A/EC_{50}$ ); RR<sub>%</sub> max – a NECA, CPA és CHA százalékos hatás - százalékos receptor rezerv függvényeinek (19. ábra) maximumai (y koordináta); E<sub>%</sub> – a NECA, CPA és CHA százalékos hatás - százalékos receptor rezerv függvények (19. ábra) maximumainak lokalizációja (x koordináta). A felhasznált  $K_A$  értékek az operatív modellel (op) illetve a Furchgott módszerrel (F) kerültek meghatározásra.

		$\rho\%$ ( $q \cdot 100\%$ )	E <sub>%</sub>
<b>NECA</b>	op	22	96.2
	F		96.9
<b>CPA</b>	op	11	98.4
	F		98.2
<b>CHA</b>	op	13	97.8
	F		98.4

**6. táblázat.** Az FSCPX által meghagyott receptorokon kiváltható maximális százalékos hatás ( $E\%$ ). Ezeket az  $E\%$  értékeket úgy kaptuk, hogy kiszámoltuk az intakt (kontroll) pitvarok NECA-ra, CPA-ra és CHA-ra adott százalékos választát  $\rho\% = q \cdot 100\%$  esetén (ami a maximális  $\rho\%$  az FSCPX-előkezelt pitvarokon). A szükséges  $K_A$  értékeket az operatív modell (op) illetve a Furchgott módszer (F) segítségével kaptuk. (A  $E\%$  maximális értéke intakt pitvaron definíciószerűen 100%.)  $q$  – a nem inaktivált receptorok hányada az FSCPX-

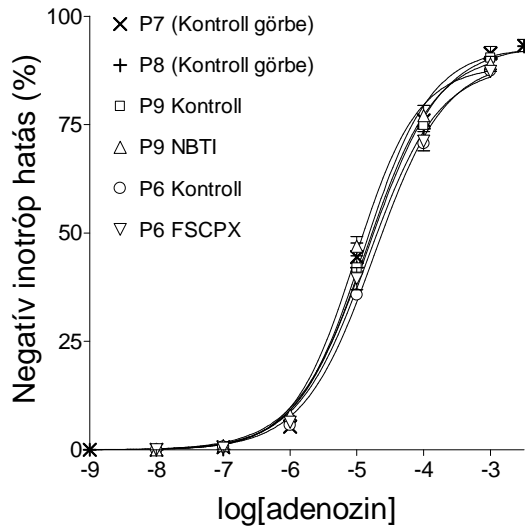
előkezelt csoportokban (Furchgott szerint);  $\rho\%$  – százalékos receptor okkupancia.



**19. ábra.** Az inotróp hatás és a receptor rezerv kapcsolata a NECA, a CPA és a CHA esetében az operatív (**A** panel) illetve a Furchgott-féle (**B** panel)  $K_A$  értékek alapján. Az x tengely a direkt negatív inotróp hatást mutatja a maximális hatás százalékában ( $E_{\%}$ ), míg az y tengely a százalékos receptor rezervet tünteti fel ( $RR_{\%}$ ). A receptor rezerv lehetséges minimuma nulla (ez a jelen ábrázolásban az x tengely), elérhetetlen felső korlátja pedig a  $E_{\%}$  értéke (ami itt egy az origóból induló és az x tengellyel  $45^{\circ}$ -os szöget bezáró egyenes). Az ábrán látható függvények - különösen kis százalékos hatásoknál - szorosan megközelítik ezt a maximumot (de végig alatta maradnak).

#### 4.2.4. Az $A_1$ adenzin receptor rezerv az adenzin direkt negatív inotróp hatására nézve

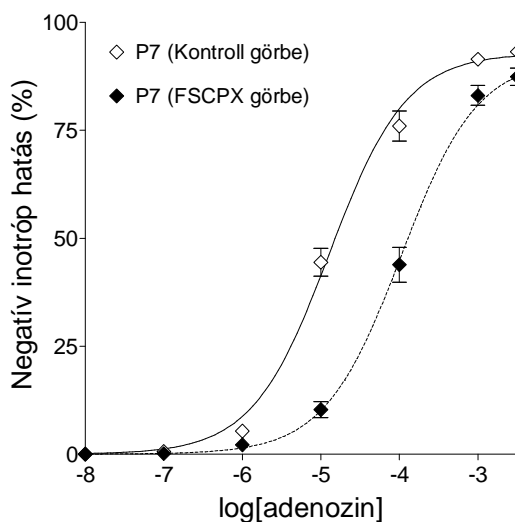
A 6. protokollhoz tartozó két csoport (P6 Kontroll és P6 FSCPX), valamint a 7., 8. és 9. protokoll pitvarainak adenzin-érzékenysége: Az adenzin koncentrációfüggően gyengítette a P6 Kontroll és P6 FSCPX csoportok pitvarainak, valamint a 7., 8. és 9. protokoll pitvarainak kontrakciós erejét is. Az első adenzin E/c görbék Hill paraméterei alapján nem volt szignifikáns eltérés az egyes csoportok között, tehát a P6 Kontroll csoport, P6 FSCPX csoport, továbbá a 7., 8. és 9. protokoll pitvarai homogén populációt képeztek az adenzinra adott válasz szempontjából (20. ábra).



**20. ábra.** Az adenosinra adott direkt negatív inotróp válasz a P6 Kontroll csoport, P6 FSCPX csoport, valamint a 7., 8. és 9. protokoll csoportjainak pitvarai esetében. Az x tengely az adenosin moláris koncentrációjának tízes alapú logaritmusát mutatja, az y tengely pedig a pitvarok kontrakciós erejének csökkenését a kiindulási érték százalékában. A szimbólumok az egyes koncentrációkra adott válaszok csoportátlagát jelzik ( $\pm$  SEM), a görbék pedig a rájuk illesztett Hill egyenletet. A pitvarok itt még *in vitro* kezeletlenek (az

NBTI és az FSCPX a csoport nevében a későbbi *in vitro* kezelésre utal).

Az FSCPX hatása: A szintetikus  $A_1$  receptor agonisták E/c görbéihez hasonlóan az FSCPX előkezelés szignifikánsan növelte az adenosin E/c görbe  $\log EC_{50}$ -ét is és alig befolyásolta az  $E_{max}$  és az n paramétereket a kontrollhoz képest. Az FSCPX tehát az adenosin esetén is jobbra tolta a E/c görbét, ami a kompetitív antagonizmus képét utánozza (21. ábra). Ugyanakkor, míg a szintetikus  $A_1$  receptor agonisták E/c görbéi jól szaturálódtak még FSCPX jelenlétében is (főleg a NECA és a CPA esetében), az adenosin E/c görbe az FSCPX előkezelés után nem szaturálódott teljesen (21. ábra).



**21. ábra.** Az adenosinra adott direkt negatív inotróp válasz a P7 csoportban FSCPX előkezelés előtt és után. Az x tengelyen az adenosin moláris koncentrációjának tízes alapú logaritmus látható, míg az y tengelyen a pitvarok kontrakciós erejének csökkenése a kiindulási érték százalékában. A szimbólumok az egyes koncentrációkra adott válaszok csoportátlagát jelzik ( $\pm$  SEM), a görbék pedig a rájuk illesztett Hill egyenletet. A P7 Kontroll görbe (folytonos vonal) az intakt  $A_1$  adenosin receptor

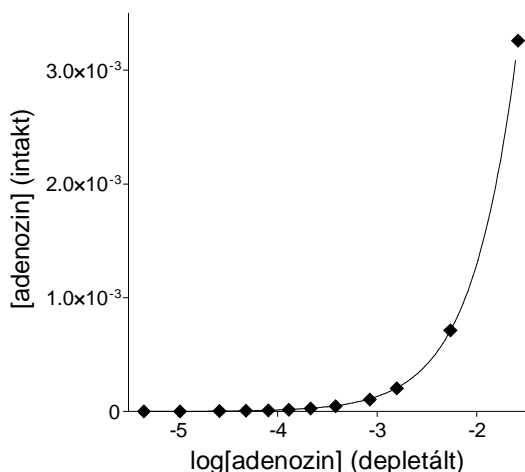
populációjú állapotot mutatja, míg a P7 FSCPX görbe (pontosított vonal) az FSCPX által depletált  $A_1$  adenosin receptorkészlet következményét jeleníti meg.

*Az operatív  $K_A$  meghatározása:* Az adenzin E/c görbék önkontrollos kísérleti elrendezése (az FSCPX előtti és utáni E/c görbék ugyanazokon a pitvarokon lettek felvéve) lehetővé tette, hogy az operatív paramétereket ne csak a csoporton belül átlagolt E/c adatokra határozzuk meg, hanem egyedi E/c görbékre is. Ezek az eredmények jó egyezést mutattak egymással (7. táblázat). Összhangban az adenzin full agonista természetével, az adenzin  $E_m$  értéke megközelítette a szintetikus agonisták  $E_m$ -eit (vö.: 3. és 7. táblázat). Az adenzin  $K_A$ -ja két-három nagyságrenddel nagyobbak mutatkozott, mint a szintetikus agonistáké, a  $\tau$  viszont hasonló volt, mint a CPA esetében (vö.: 3. és 7. táblázat).

*A Furchgott-féle  $K_A$  meghatározása:* A 13. egyenlet az adenzin esetében is csak a szigmoid függvény alsó görbületét rajzolta meg (22. ábra), mivel az FSCPX nem tudta lényegesen csökkenteni az adenzin E/c görbe  $E_{max}$ -át, ahogy a szintetikus agonistákét sem (21. ábra). Noha a  $q$  hasonló volt a szintetikus agonistákra meghatározott  $q$ -hoz (ld.: 4. táblázat), a  $K_A$  igen nagy volt (8. táblázat).

	<b>P7 Kontroll</b>		<b>P7 FSCPX</b>	
	<b>átlagolt görbe adatok</b>		<b>individuális görbe adatok</b>	
<b><math>E_m</math> (%)</b>	93.1		94.19 ± 1.12	
<b>95% CI</b>	90.29 – 95.91		–	
<b>log<math>K_A</math></b>	-2.05		-2.1 ± 0.25	
<b>95% CI</b>	-3.38 – -0.71		–	
<b><math>K_A</math> (mM)</b>	8.93		8.01	
<b>log<math>\tau</math></b>	2.84	1.92	2.76 ± 0.23	1.88 ± 0.28
<b>95% CI</b>	1.48 – 4.2	0.6 – 3.24	–	–
<b><math>\tau</math></b>	695.02	83.18	574.45	76.05
<b><math>n_{op}</math></b>	0.89		0.96 ± 0.07	
<b>95% CI</b>	0.78 – 0.99		–	

**7. táblázat.** Az FSCPX hatása az adenzin kiváltotta direkt negatív inotrópiára az agonizmus operatív modellje alapján. Az  $E_m$ , log $K_A$ , log $\tau$  és  $n_{op}$  értékek a csoportonként átlagolt E/c görbe-családokra valamint az individuális E/c görbe párokra illesztett 12. egyenlet regressziós paraméterei (az individuális görbék esetében: számtani közép ± SEM). 95% CI – a regressziós paraméterek 95%-os konfidencia intervalluma az átlagolt E/c görbék feldolgozása során.



**22. ábra.** Az ekvielektív adenosin koncentrációk kapcsolata az intakt és az FSCPX által depletált  $A_1$  receptor populációjú pitvarokon. Az x tengely az FSCPX-előkezelt pitvarokra kiszámolt moláris adenosin koncentrációk tízes alapú logaritmusát mutatja, míg az y tengely az intakt pitvarokhoz tartozó moláris adenosin koncentrációkat. A szimbólumok az intakt pitvarokhoz tartozó adenosin koncentrációkat mutatják, melyek ekvielektívek az FSCPX-

előkezelt pitvarokhoz tartozó adenosin koncentrációkkal a 12 önkényes hatás érték esetében. A görbe az illesztett Furchgott modellt (13. egyenlet) illusztrálja.

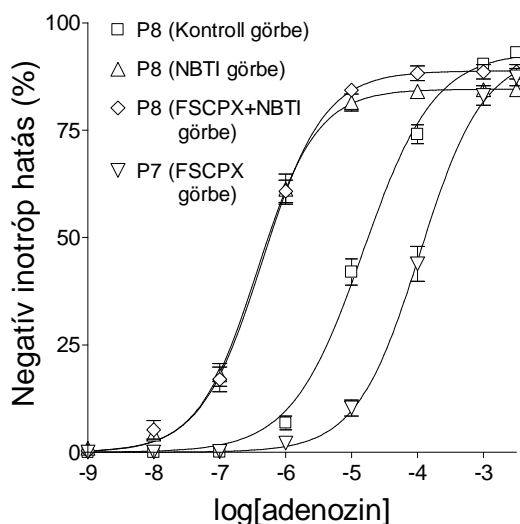
	adenozin
$\log K_A$	-0.4
95% CI	-0.49 – -0.31
$K_A$ (mM)	398.1
q	0.133
95% CI	0.131 – 0.134

**8. táblázat.** Az FSCPX hatása az adenosin kiváltotta direkt negatív inotrópiára Furchgott módszerével jellemezve. A  $\log K_A$ -t és az FSCPX-előkezelt pitvarokra vonatkozó q-t a 13. egyenlet illesztése szolgáltatja. 95% CI – a regressziós paraméterek 95%-os konfidencia intervalluma.

*Az adenosinhoz tartozó  $A_1$  receptor rezerv meghatározására irányuló első próbálkozás kudarcra:* Szemben a szintetikus agonisták jól egyező operatív és Furchgott-féle  $K_A$  értékeivel, az adenosin esetében a különböző módszerekkel meghatározott  $K_A$  értékek jelentősen különböztek egymástól (vö.: 7. és 8. táblázat). A kétféle  $K_A$  közötti csaknem két nagyságrendnyi eltérés (8-9 mM vs. 398.1 mM) megkérdőjelezte az adenosin E/c görbék adataiból meghatározott operatív illetve Furchgott-féle paraméterek megbízhatóságát. Emiatt az adenosinra vonatkozó  $K_A$ -ból nem számoltunk sem PSR-t, sem százalékos receptor rezervet ( $RR\%$ ).

*Az adenosinhoz tartozó  $A_1$  receptor rezerv meghatározását célzó második próbálkozás kudarcra:* A munkacsoport korábbi eredményeivel összhangban az NBTI látványosan balra tolta az adenosin E/c görbét és kismértékben csökkentette az  $E_{max}$ -ot (23. ábra). Megdöbbenésünkre ugyanakkor az FSCPX előkezelés, amely önmagában jobbra

tolta az adenzin E/c görbét a kontrollhoz képest (21., 23. ábra), kismértékben ugyan, de statisztikailag szignifikánsan ellensúlyozta az NBTI hatását az  $E_{max}$ -ra anélkül, hogy a  $\log EC_{50}$ -et és a Hill koefficienszt befolyásolta volna (23. ábra, 9. táblázat). Az FSCPX előkezelés tehát a látszat szerint fokozta az adenzin hatását NBTI jelenlétében.



**23. ábra.** Az FSCPX előkezelés és az NBTI külön-külön vett illetve együttes hatása az adenzin kiváltotta direkt negatív inotrópiára. A P7 Kontroll görbét (ami nem különbözött szignifikánsan a P8 Kontroll görbétől) az egyszerűség kedvéért nem tüntettük fel. Az x tengely az adenzin moláris koncentrációjának tízes alapú logaritmusát mutatja, az y tengely pedig a pitvarok kontrakciós erejének csökkenését jelzi a kiindulási érték százalékában. A szimbólumok az egyes koncentrációkra adott

válaszok csoportátlagát mutatják ( $\pm$  SEM), a görbék pedig a rájuk illesztett Hill egyenletet.

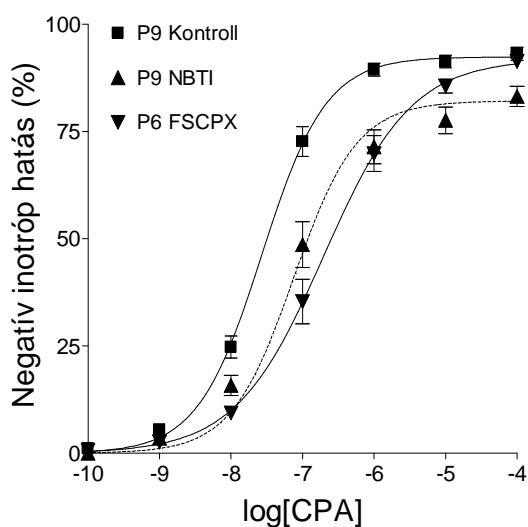
	P7 Kontroll	P7 FSCPX	P8 Kontroll	P8 NBTI	P8 FSCPX+NBTI
$E_{max}$ (%)	93.54 $\pm$ 1.01	92.6 $\pm$ 1.8	93.28 $\pm$ 0.82	84.6 $\pm$ 1.44 ***	88.92 $\pm$ 1.77 *; $\neq$
$\log EC_{50}$	-4.86 $\pm$ 0.07	-3.96 $\pm$ 0.07 ***	-4.83 $\pm$ 0.08	-6.43 $\pm$ 0.07 ***	-6.36 $\pm$ 0.05 ***
$EC_{50}$ ( $\mu$ M)	13.8	109.65	14.79	0.37	0.44
n	0.93 $\pm$ 0.09	0.98 $\pm$ 0.07	0.82 $\pm$ 0.03	1 $\pm$ 0.06	0.98 $\pm$ 0.1

**9. táblázat.** Az FSCPX előkezelés és az NBTI hatása (külön-külön és együtt) a pitvari direkt negatív inotróp válaszra a 7. és 8. protokoll adenzin E/c görbéin. Az  $E_{max}$ ,  $\log EC_{50}$  és n (számtani közép  $\pm$  SEM) az individuális görbékre illesztett Hill egyenlet paraméterei. Az  $EC_{50}$  a  $\log EC_{50}$  antilogaritmus (számtani közép). A statisztikai szignifikancia szintjét jeleztük: \*: a P7 FSCPX görbe, a P8 NBTI görbe illetve a P8 FSCPX+NBTI görbe vs. a nekik megfelelő kontroll adenzin E/c görbe (P7 Kontroll illetve P8 Kontroll), valamint P8 Kontroll görbe vs. P7 Kontroll görbe;  $\neq$ : P8 FSCPX+NBTI görbe vs. P8 NBTI görbe.



Az adenzinhez tartozó  $A_1$  receptor rezerv meghatározására irányuló harmadik próbálkozás (a második próbálkozás során NBTI jelenlétében felvett adenzin E/c görbék korrekciója): A CPA az adenzinhez hasonlóan koncentrációfüggően csökkentette a pitvarok nyugalmi kontrakciós erejét. Ezt a direkt negatív inotróp hatást mind az előzetesen jelenlévő FSCPX, mind a jelenlévő NBTI gátolta (külön-külön). Az FSCPX előkezelés, hasonlóan az adenzin E/c görbénél tapasztaltakhoz (21. ábra), a CPA E/c görbének is csak a  $\log EC_{50}$ -ét befolyásolta (magnövelte) (24. ábra, 10. táblázat), vagyis a kompetitív antagonizmus képét mutatta, noha az FSCPX irreverzibilis antagonista. Az NBTI ugyanakkor mindhárom Hill paramétert befolyásolta: csökkentette az  $E_{max}$ -ot és a Hill koefficiens, valamint növelte a  $\log EC_{50}$ -et (24. ábra, 10. táblázat).

A P9 NBTI csoport átlagolt CPA E/c görbéjére illesztett, a P9 Kontroll csoport átlagolt CPA E/c görbéjének Hill-féle paramétereit tartalmazó 15. egyenlet regressziós paramétere  $\log(c_x) = -7.346$  volt (megnyugtatóan szűk,  $-7.454$  és  $-7.237$  közötti 95%-os konfidencia intervallum mellett). Az RRM szerint tehát az NBTI hatására interstitialisan felhalmozódó endogén adenzin többlet  $45.08$  nM CPA-val volt ekvifektív.



**24. ábra.** A CPA direkt negatív inotróp hatása NBTI és FSCPX hiányában illetve jelenlétében. A P6 Kontroll csoport CPA E/c görbéjét (ami nem különbözött szignifikánsan a P9 Kontroll csoport CPA E/c görbéjétől) az egyszerűség kedvéért nem ábrázoltuk. Az x tengely a CPA koncentrációjának moláris tízes alapú logaritmusát jelöli, míg az y tengely a pitvarok kontrakciós erejének csökkenését a kiindulási érték százalékában. A szimbólumok az egyes CPA koncentrációkra

adott válaszok csoportátlagát jelzik ( $\pm$  SEM). A folyamos vonalak az illesztett Hill egyenletet, míg a pontozott vonal az RRM illesztett egyenletét reprezentálják.

A matematikai korrekció megváltoztatta az NBTI jelenlétében felvett adenzin E/c görbék hatás értékeinek egymáshoz való viszonyát. Mivel a teljes (endogén + exogén) adenzin koncentráció ismeretlen az  $A_1$  receptorok mikro környezetében, a P8 NBTI és P8

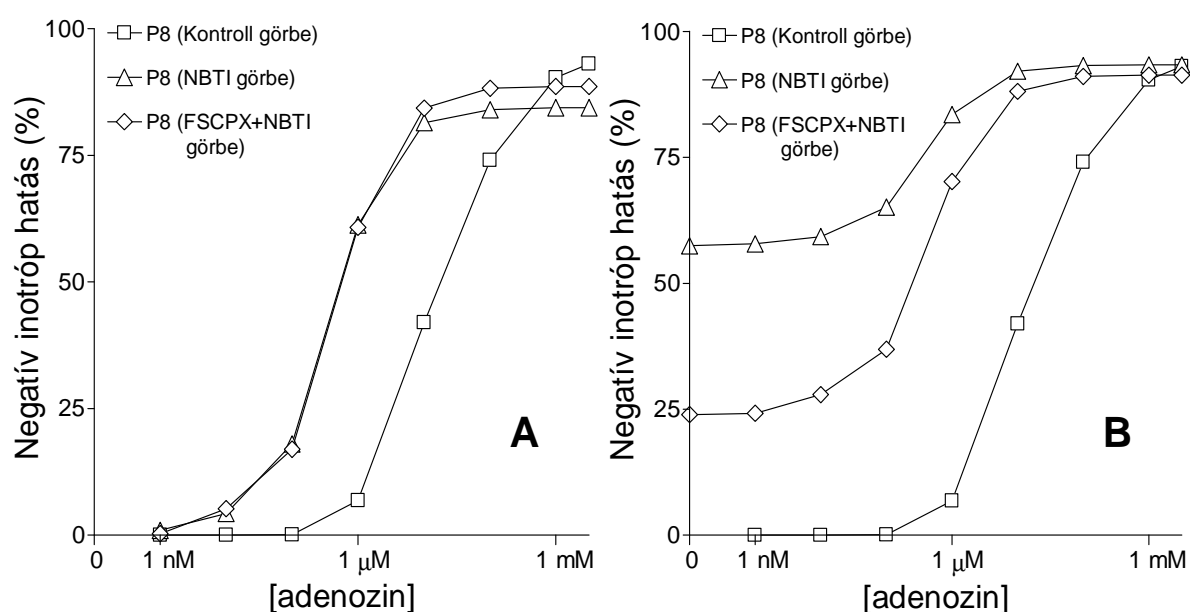
FSCPX+NBTI görbék korrigált hatás értékeit a szervkádbeli exogén adenzin koncentrációjának függvényében ábrázoltuk (25. ábra). Emiatt sajnos az ily módon transzformált E/c görbék végül is nem voltak alkalmasak receptor rezerv számszerű meghatározásához.

Az NBTI okozta torzulás korrekciója azonban lehetővé tette, hogy az ugyanazon x értékekhez tartozó hatások megbízhatóan összehasonlíthatóak legyenek (mivel valamennyien tisztán az exogén adenzin által kifejtett hatásról adnak információt, akárcsak az NBTI nélkül felvett adenzin E/c görbék). A korrigált hatások maximumai a következők voltak: 93.36% a P8 NBTI görbénél és 91.33% a P8 FSCPX+NBTI görbénél. (Összehasonlításul: az átlagolt P8 Kontroll görbe eleve korrektnek számító legnagyobb hatás értéke 93.06 volt.) Így a korrigált P8 NBTI és P8 FSCPX+NBTI görbék – a farmakológiai logikával összhangban – helyet cseréltek egymással az eredeti görbékhez képest. A korrigált P8 NBTI és P8 FSCPX+NBTI görbék szaturálódott (végső) része ugyanakkor nagyon közel került egymáshoz, ami nagy A<sub>1</sub> receptor rezervre utal az adenzin direkt negatív inotróp hatásra nézve tengerimalac pitvaron (25. ábra).

	<b>P9 Kontroll</b>	<b>P9 NBTI</b>	<b>P6 Kontroll</b>	<b>P6 FSCPX</b>
<b>E<sub>max</sub> (%)</b>	92.54 ± 1.54	82.06 ± 2.34 ***	90.22 ± 1.21	91.78 ± 0.8 ###
<b>logEC<sub>50</sub></b>	-7.56 ± 0.07	-7.16 ± 0.11 *	-7.59 ± 0.06	-6.7 ± 0.13 ***; ≠
<b>EC<sub>50</sub> (nM)</b>	27.54	69.34	25.76	201.37
<b>n</b>	1 ± 0.03	0.78 ± 0.07 *	0.89 ± 0.03	0.83 ± 0.04

**10. táblázat.** Az FSCPX előkezelés és az NBTI hatása (külön-külön) a pitvari direkt negatív inotróp hatásra a 6. protokoll (P6 Kontroll és P6 FSCPX csoportok) és a 9. protokoll CPA E/c görbéin. Az E<sub>max</sub>, logEC<sub>50</sub> és n (számtani közép ± SEM) az individuális CPA E/c görbékre illesztett Hill egyenlet regressziós paraméterei. Az EC<sub>50</sub> a logEC<sub>50</sub> antilogaritmus (számtani közép). A statisztikai szignifikancia szintjét jeleztük: \* - a P9 NBTI csoport illetve a P6 FSCPX csoport vs. a nekik megfelelő kontroll csoport (P9 Kontroll vagy P6 Kontroll), valamint P6 Kontroll csoport vs. P9 Kontroll csoport; ≠ - a P6 FSCPX csoport vs. a P9 NBTI csoport.

Túl azon, hogy mindkét korrigált E/c görbe jelentősen balra tolódott a kontroll görbéhez képest (amelyet eleve korrektnek tekintünk), a korrigált P8 NBTI görbe mindvégig a kontroll és a korrigált P8 FSCPX+NBTI görbe felett fut, míg a korrigált P8 FSCPX+NBTI görbe a kontroll görbe alá került a legnagyobb (exogén) adenzin koncentrációnál (3 mM) (25. ábra). Noha a három görbe közötti különbségek elég kicsik a legnagyobb adenzin koncentrációnál, összhangban vannak a munkacsoport azon korábbi eredményeivel, hogy az NBTI fokozza az adenzinra adott választ (mivel gátolja annak intracelluláris bontását), szemben az FSCPX-el, amely gyengíti az adenzin hatását.



**25. ábra.** A P8 Kontroll, P8 NBTI és P8 FSCPX+NBTI görbék konvencionális kiértékeléssel kapott hatás értékei (A panel), továbbá a P8 NBTI és P8 FSCPX+NBTI görbék korrigált hatás értékei az eredetileg is korrekt P8 Kontroll görbe konvencionális hatás értékeivel (B panel), valamennyien az exogén adenzin szervkádbeli koncentrációjának függvényében ábrázolva. Az A panelen ábrázolt E/c görbe adatok (a P7 FSCPX görbe hiányától eltekintve) megegyeznek a 23. ábrán bemutatott adatokkal. A P8 NBTI és a P8 FSCPX+NBTI görbék hatás értékeit a 9. protokoll és a P6 FSCPX csoport átlagolt CPA E/c görbé segítségével korrigáltuk (a P6 Kontroll csoport csak a hosszú inkubációs idő hatásának felmérésére szolgált). A görbék neve a kapott *in vitro* kezelésre utal (kontroll, NBTI, FSCPX+NBTI). Az x tengelyen az exogén adenzin moláris koncentrációját vettük fel logaritmus skálán, az y tengely pedig a pitvarok kontrakciós erejének csökkenését mutatja a kiindulási érték százalékában. A szimbólumok az adenzinra adott átlagolt válaszokat (P8 Kontroll görbe), illetve a matematikailag korrigált átlagolt válaszokat (P8 NBTI görbe és P8 FSCPX+NBTI görbe) jelzik.

A transzformált P8 NBTI illetve P8 FSCPX+NBTI görbék kezdeti (vagyis zérus exogén adenzin koncentráció mellett) korrigált hatás értékei 57.44% illetve 23.97% voltak a zérus helyett (25. ábra). Ezeket az értékeket a  $c_x$  negatív inotróp hatásaként ( $E_x$ ) számítottuk ki külön a natív és a depletált  $A_1$  receptor populációjú pitvarokra, megbecsülendő az NBTI okozta endogén adenzin felhalmozódás ( $c_{bias}$ ) negatív inotróp hatását ( $E_{bias}$ ; ld.: 14. és 15. egyenlet). Az FSCPX-előkezelt pitvarokhoz tartozó kevesebb mint feleakkora  $E_{bias}$  érték magyarázatot ad arra, miért okozott az NBTI kisebb torzulást az eredeti (transzformálatlan) P8 FSCPX+NBTI görbén, mint az eredeti P8 NBTI görbén. A kisebb  $E_{bias}$  és ezáltal az exogén adenzin által kiváltott hatás kisebb torzítása vezetett ahhoz a paradox jelenséghez, hogy az eredeti P8 FSCPX+NBTI görbe  $E_{max}$ -a nagyobb volt, mint az eredeti P8 NBTI görbe  $E_{max}$ -a (23., 25. ábra).

## 5. Megbeszélés

### 5.1. A tengerimalac pitvari A<sub>1</sub> adenzin receptor CPX iránti affinitásának változása 8 napos tiroxin-kezelés után

Egy agonista affinitásának meghatározása egy adott receptor iránt elméleti csapdákat rejt magában. Ez fokozottan érvényes a G protein-kapcsolt receptorokra, különösen akkor, ha a meghatározás funkcionális assay-vel történik (Colquhoun, 1998, 2007). A jelen vizsgálatban ezért az eu- és a hyperthyreoid A<sub>1</sub> receptor ortoszterikus kötőhelyének affinitását határoztuk meg CPX-szel szemben, ami jól ismert szelektív, kompetitív és ortoszterikus A<sub>1</sub> receptor antagonistá (Fredholm és mtsai, 2001, 2011; IJzerman és mtsai, 2012). Mivel a pitvari A<sub>1</sub> receptorra jellemző direkt negatív inotróp választ mértük mint hatást, eredményeink természetesen elsősorban a pitvari cardiomyocytákra érvényesek.

Agonistaként adenzint és CPA-t használtunk. Az élő szövetben rövid féléletidejű adenzin az adenzin receptorok endogén full agonistája, míg a szintetikus CPA relatíve stabil vegyület, amely az A<sub>1</sub> receptor szelektív full agonistája (Fredholm és mtsai, 2001, 2011; IJzerman és mtsai, 2012). Az adenzin gyorsan metabolizálódik az élő szövetekben (Wilbur és Marchlinski, 1997; Pavan és IJzerman, 1998), ezzel szemben a CPA lassan eliminálódik a mi kísérletes körülményeink között, azaz vértelen tengerimalac pitvaron (Gesztelyi és mtsai, 2004). Eliminációjuk sebességének különbözőségéből fakadóan az adenzin lehetővé tette önkontrollos kísérleti elrendezés alkalmazását (egymás után két E/c görbe felvételét ugyanazon a preparátumon, relatíve rövid mosási periódussal elválasztva). A CPA esetében viszont külön preparátumon került felvételre a kontroll és az antagonistá jelenlétét tükröző E/c görbe.

A CPX adenzinnal illetve CPA-val való kompetícióját mutató E/c görbéket Schild analízissel értékeltük ki a Motulsky és Christopoulos (2004) által leírt eljárást követve. Széles körben elfogadott, hogy a Schild analízis egzakt és megbízható módja annak, hogy egy receptor ortoszterikus kötőhelyét jellemezzük (az eredmény független a receptor adott szövetre illetve adott hatásra jellemző jelátviteli útjaitól). A kapott K<sub>B</sub> érték fiziko-kémiai jelentéssel bíró állandó, megadja az antagonistá-receptor komplex egyensúlyi disszociációs

állandóját (Motulsky és Christopoulos, 2004; Giraldo és mtsai, 2007; Wyllie és Chen 2007; Colquhoun, 2007; Kenakin, 2009). Ezekből következően a Schild módszer alkalmas az eltérő thyreoid állapotú szövetekben expresszáldó  $A_1$  receptorok affinitásának összehasonlítására is, annak ellenére, hogy a thyreoid hormonok ( $T_3$ ,  $T_4$ ) számos olyan jelátviteli utat befolyásolnak, amely érinti a pitvari  $A_1$  receptor negatív inotróp hatását (Rubinstein és Binah, 1989; Kaasik és mtsai, 1994, 1997a, 1997b; Bosch és mtsai, 1999; Ojamaa és mtsai, 2000a, 2000b; Shenoy és mtsai, 2001; Sunagawa és mtsai, 2005).

A jelen vizsgálat E/c görbe-családjaira a Schild egyenlet módosított formáját (7. egyenlet) illesztettük globális módon. A globális illesztésnek három előnye is van az Arunlakshana és Schild (1959) által leírt eredeti eljáráshoz képest:

1. A globális illesztés minimalizálja a E/c görbe adatokban rejlő hibák hatását a regressziós paraméterekre.
2. Globális illesztés esetén kevésbé torzítja az eredményt, ha az antagonist jelenlétében felvett E/c görbék nem szaturálódtak teljesen. Mivel egy nem telítődött E/c görbe kevésbé alkalmas individuális illesztésre (nem ad megbízható  $EC_{50}$ -et), ilyen esetben a globális illesztés az egyetlen jó megoldás.
3. A globális illesztés lehetővé teszi a variábilis és a rögzített ( $S=1$ ) Schild koefficienssel végzett illesztés objektív összehasonlítását F teszt segítségével (és ezzel kiteljesíti a Schild koefficiens ellenőrző funkcióját).

A jelen vizsgálat adenzin E/c görbe-családjaira a variábilis koefficiensű Schild modell illeszkedése volt jobb, vagyis a kapott  $pA_2$  regressziós paramétereket nem lehetett  $pK_B$  értéknek (tehát molekuláris jelentéssel bíró állandónak) tekinteni (1. táblázat). Ezzel ellentétben a CPA E/c görbe-családokra a rögzített ( $S=1$ ) koefficiensű Schild modell illeszkedett jobban, tehát a kapott  $pA_2$  paraméterek egyben  $pK_B$  értékek is, amelyek tisztán a CPX és az  $A_1$  receptor kapcsolódási képességét jellemzik (1. táblázat). Ez feltehetően az adenzin és a CPA kötőhely-specifititásának különbségére vezethető vissza: az adenzin az intracelluláris P-site-hoz kötődve is csökkenti a pitvari kontrakciós erőt (Tesmer és mtsai, 2000), míg a CPA szelektív  $A_1$  receptor agonista (Fredholm és mtsai, 2001, 2011; IJerman és mtsai, 2012) (7. ábra). Ezt az elképzelést támogatja az a korábbi megfigyelés is (Collis és mtsai, 1989), hogy a Schild analízis CPX-szel gátolt adenzin E/c görbék esetén is 1-től szignifikánsan nem különböző Schild koefficienszt ad, ha dipiridamol is jelen van a rendszerben (vagyis nukleozid transzport gátló, amely akadályozza az adenzin beáramlását a sejtekbe) (11. táblázat). Mivel a hyperthyreoid állapot nem változtatja meg a

sejtmembránon keresztüli adenzin transzport irányát tengerimalac pitvaron (Karsai és mtsai, 2007), az exogén adenzin intracelluláris támadásponttal kifejtett hatásai a tiroxin-kezelt pitvarokon is befolyásolhatták a jelen vizsgálat eredményét.

A CPA E/c görbék révén kapott  $pK_B$  értékek kisebbek voltak a hyperthyreoid pitvarokon, mint az euthyreoidokon (át nem fedő 95%-os konfidencia intervallumok mellett). Ezzel összhangban egyébként az adenzin E/c görbék  $pA_2$  értékei is kisebbek voltak a hyperthyreoid pitvarokon (1. táblázat). A jelen értekezést megalapozó első vizsgálati modell kísérletei szerint tehát a thyreoid hormonok módosítják a pitvari myocardialis  $A_1$  receptor ortoszterikus kötőhelyének szerkezetét, mérsékelten csökkentve annak az  $A_1$  receptor antagonistá CPX-szel szembeni affinitását. Legjobb tudomásunk szerint ezt munkacsoportunk mutatta ki elsőként tengerimalacban.

Eredményeink jelentőségét aláhúzza, hogy viszonylag kevés információval rendelkezünk a kardiális  $A_1$  receptor affinitásának változásáról hyperthyreosisban. A legtöbb K érték (amely a CPX és az  $A_1$  receptor ekvilibrium disszociációs konstansát becsli) az euthyreoid állapotot jellemzi. A tengerimalac pitvarra vonatkozó irodalmi K értékek jó egyezést mutatnak a jelen vizsgálat eredményeivel (11. táblázat). Patkány kamrán a thyreoid hormonok nem változtatták meg szignifikánsan a K értékeket (ami változást tapasztaltak, az is inkább az affinitás növekedése volt, semmint csökkenése). Hyperthyreoid patkány pitvaron azonban az  $A_1$  receptor affinitásának kismértékű csökkenéséről számoltak be trícíált CPX iránt. Ez a különbség azonban elég kicsi volt (kisebb, mint a jelen vizsgálatban észlelt változás, vö.: 1. és 11. táblázat), amit a vizsgálók jelentéktelennek tartottak. Érdekes módon a thyreoid hormonok hiánya egy beszámoló szerint szintén csökkentette az  $A_1$  receptor affinitását patkány vesében (11. táblázat).

Régről ismert, hogy a tiroxin-kezelés számottevően csökkenti az  $A_1$  receptor mediálta direkt negatív inotróp hatást (Szentmiklósi és mtsai, 1992; Gesztelyi és mtsai, 2003a, 2003b). Ezt a jelen vizsgálat során is tapasztalt jelenséget (12., 13. ábra) nehezen lehetne megmagyarázni önmagában az  $A_1$  receptor affinitáscsökkenésével (1. táblázat), feltehetően más mechanizmusok is érintettek. Valószínűnek látszik, hogy az adenzin metabolizmus enzimeinek és transzportereinek hyperthyreoid szívben mért fokozott aktivitása (Smolenski és mtsai, 1995) is hozzájárul az adenzin csökkent negatív inotróp hatásához. Ezt az is alátámasztja, hogy az enzimátikus átalakítással szemben sokkal ellenállóbb CPA (Pavan és IJerman, 1998; Gesztelyi és mtsai, 2004) E/c görbéje kisebb csökkenést szenved el tiroxin-kezelés hatására, mint az adenziné (vö.: 12. és 13. ábra). A

CPA E/c görbe jobbra tolódása a hyperthyreoid pitvarokon az euthyreoidokhoz képest azonban még így is túl nagyak tűnik ahhoz, hogy azt önmagában a hyperthyreoid A<sub>1</sub> receptor affinitáscsökkenésével magyarázni lehessen. Ezek alapján további vizsgálatokra van szükség a thyreoid hormonok szívre kifejtett hatásának mechanizmusát illetően.

K (nM)	pK	Tireoid státusz	Preparátum	Hivatkozás
K <sub>B</sub> = 8.1	8.09	eu	tengerimalac pitvar	Tawfik-Schlieper és mtsai, 1989
K <sub>d</sub> = 1.3	8.89			
K <sub>B</sub> = 12.3	7.91	eu	tengerimalac pitvar	Collis és mtsai, 1989
K <sub>B</sub> = 9.6	8.02	eu	tengerimalac pitvar	Wilken és mtsai, 1990
K <sub>i</sub> = 2	8.7	eu	rekombináns humán A <sub>1</sub> receptor	Robeva és mtsai, 1996
K <sub>i</sub> = 0.12	9.92	eu	patkány vesekéreg	Franco és mtsai, 2004
K <sub>i</sub> = 0.82	9.09	hypo		
K <sub>i</sub> = 0.74	9.1	eu	patkány vesevelő (külső rész)	
K <sub>i</sub> = 0.84	9.08	hypo		
K <sub>d</sub> = 0.13	9.89	eu	patkány kamra	El-Ani és mtsai, 1994
<b>K<sub>d</sub> = 0.11</b>	<b>9.96</b>	<b>hyper</b>		
K <sub>d</sub> = 0.46	9.34	eu	patkány pitvar	Balas és mtsai, 2002
<b>K<sub>d</sub> = 0.53</b>	<b>9.28</b>	<b>hyper</b>		
K <sub>d</sub> = 0.29	9.54	eu	patkány kamra	
<b>K<sub>d</sub> = 0.27</b>	<b>9.57</b>	<b>hyper</b>		

**11. táblázat.** Különböző módszerekkel különböző preparátumokon kapott K értékek, melyek a CPX (vagy [<sup>3</sup>H]CPX) és az A<sub>1</sub> receptor komplexének ekvilibrium disszociációs konstansát mutatják. A K<sub>B</sub> értékeket funkcionális assay-vel határozták meg (vö.: 1. táblázat). A K<sub>d</sub> és a K<sub>i</sub> értékek radioligand assay-ből származtak, melyekben az antagonistá vagy a radioligand volt (K<sub>d</sub>), vagy a kompetitor (K<sub>i</sub>). pK – a K negatív tízes alapú logaritmus; CPX – 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine; [<sup>3</sup>H]CPX – trícíált CPX; eu – euthyreoid; hypo – hypothyreoid (*dől*t); hyper – hyperthyreoid (**félkövér**).



Túl inotróp működésén, az  $A_1$  receptornak számos funkciója van a szívben (pl. negatív kronotróp és dromotróp hatás) és csaknem minden emlős szövetben (pl. adaptív és regeneratív folyamatok iniciálása) (Headrick és mtsai, 2003, 2011; Headrick és Lasley 2007; Fredholm és mtsai, 2001, 2011). Fontos hangsúlyozni, hogy az  $A_1$  receptor ortoszerikus kötőhelye ugyanaz minden  $A_1$  receptort hordozó szövetben, ezért affinitásának csökkenése hyperthyreosisban elvileg minden biológiai folyamatot érinthet, melynek mediálásában az  $A_1$  receptorok részt vesznek (pl. hozzájárulhat fokozott arrhythmia-hajlam kialakulásához is).

A jelen disszertáció első vizsgálati modelljének fő eredménye tehát az, hogy a tengerimalac pitvari  $A_1$  receptor affinitása hyperthyreosisban mérsékelt fokú csökkenést mutat CPX iránt az euthyreoid állapothoz képest, amelyből valamennyi ortoszerikus ligandjával szembeni affinitásának csökkenésére lehet következtetni. Ez hozzájárulhat az  $A_1$  receptor mediálta valamennyi folyamat gyengüléséhez hyperthyreoid állapotban. Tekintettel az adenzin és a CPA direkt negatív inotróp hatásának jelentős csökkenésére a hyperthyreoid pitvarokon, feltételezhető, hogy ez a kismértékű affinitáscsökkenés csak részben felelős a jelenségért. A jelen vizsgálat során azt is megállapítottuk, hogy a CPX nem csak eu-, hanem hyperthyreoid állapotban is tisztán kompetitív antagonistája a tengerimalac pitvari  $A_1$  receptornak.

## 5.2. A direkt negatív inotróp hatás $A_1$ adenzin receptor rezervje tengerimalac pitvaron

A tengerimalac pitvari myocardium  $A_1$  receptor rezervjének meghatározását funkcionális assay-k segítségével végeztük, melyek a farmakológia klasszikus eszközén, E/c görbék elemzésén alapulnak. A receptor rezerv kvantifikálásához először meg kellett határozni az alkalmazott agonista ekvilibrium disszociációs konstansát ( $K_A$ ) és a E/c görbét geometriailag leíró (empirikus) paramétereket.

A  $K_A$  értékeket, amelyek az  $A_1$  receptor affinitását kvantifikálták a szintetikus agonistákhoz (NECA, CPA, CHA) és az adenzinhez, két módszerrel is meg kívántuk határozni, az operatív modellel (Black & Leff, 1983) és a Furchgott módszerrel (Furchgott,

1966; Furchgott & Bursztyn, 1967; Dennis és mtsai, 1992). A két módszer ugyanazokat a nyers adatokat igényli (két E/c görbét kell felvenni ugyanabban a rendszerben, egyet natív, egyet pedig depletált receptorállomány mellett) és együttes kivitelezésük növeli a kapott eredmény megbízhatóságát.

Az empirikus paraméterek ( $E_{max}$ ,  $EC_{50}$ ,  $n$ ) meghatározásához és a velük való számoláshoz a legkorábbi, legegyszerűbb, legáltalánosabb, de nagyon megbízható modellt, a Hill egyenletet választottuk ki (Hill, 1910; Gesztelyi és mtsai, 2012).

### 5.2.1. A szintetikus $A_1$ receptor agonisták affinitása receptorukhoz

Az FSCPX hatékony irreverzibilis antagonistája az  $A_1$  receptornak (Srinivas és mtsai, 1996; Morey és mtsai, 1998). Ennek ellenére vizsgálataink során az FSCPX előkezelés nem volt képes lényegesen csökkenteni a három szintetikus agonista E/c görbéjének  $E_{max}$ -át (15., 16. ábra), mintha csak az FSCPX kompetitív antagonista lenne. Ez meglepetést okozott, hiszen az FSCPX-et – a korábbi irodalmi adatokhoz képest – nagy koncentrációban (10  $\mu$ M) és hosszú ideig (45 perc inkubáció majd 75 perc mosás) alkalmaztuk (12. táblázat). Az  $E_{max}$  csökkentését fontosnak tartottuk volna, az operatív  $K_A$  pontos meghatározásához ugyanis kívánatosnak tartják a gátlószer-kezelt görbék  $E_{max}$ -ának jól látható csökkenését, ennek hiányában ugyanis pontatlanná válhat az  $E_m$  paraméter. Az  $E_m$  pontos meghatározása elengedhetetlen a többi paraméter megbízható becslése érdekében (Motulsky és Christopoulos, 2004). Esetünkben azonban három egymáshoz közeli és jelentősen átfedő 95%-os konfidencia intervallumú  $E_m$  értéket kaptunk (3. táblázat) annak megfelelően, hogy a NECA, a CPA és a CHA valamennyien full agonisták (Fredholm és mtsai, 2001). A hatás lehetséges maximumát mutató  $E_m$ -ek 100% körüli értéke összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy az  $A_1$  receptor full agonisták képesek a pitvari kontrakciók csaknem teljes megszüntetésére (Gesztelyi és mtsai, 2003a, 2003b, 2004). A kapott  $E_m$  értékek tehát összhangban vannak a korábbi eredményekkel, ami lényeges az operatív modell illesztésével szerzett többi paraméter megbízhatósága szempontjából.

A Furchgott modell illesztése is tükrözte az FSCPX általi gátlás gyengeségét az  $A_1$  receptor mediálta direkt negatív inotróp hatást illetően: a 17. ábra adatpontjai a 13. egyenlet által meghatározott szigmoid függvényeknek csak az elejét rajzolták ki (szemilogaritmikus

ábrázolás mellett). Ennek ellenére a Furchgott-féle  $K_A$  értékek jó egyezést mutatnak az operatív  $K_A$  értékekkel (vö.: 3. és 4. táblázat).

FSCPX koncentráció	FSCPX inkub.	mosás	Preparátum	Agonista	q	Hivatkozás
1 $\mu$ M	25 perc	75 perc	perfundált szív	adenozin	-	Srinivas és mtsai, 1996
10 nM 50 nM	30 perc	60 perc	izolált pitvari myocyták	adenozin	0.3 0.03	Srinivas és mtsai, 1997
2 $\mu$ M	30-45 perc	30 perc	perfundált szív	R-PIA CCPA	0.285 0.056	Morey és mtsai, 1998

**12. táblázat.** Különböző FSCPX protokollok, melyeket korábban tengerimalac szív preparátumoknál alkalmaztak. q – a nem inaktiválódott receptorok aránya az FSCPX előkezelés végére (a Furchgott módszerrel meghatározva); R-PIA – R-N<sup>6</sup>-(phenylisopropyl)adenosine; CCPA – 2-chloro-N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine.

A  $K_A$  értékek interspecies különbségei miatt (Van der Graaf & Danhof, 1997; Fredholm és mtsai, 2001) adatainkat csak tengerimalac szívre vonatkozó értékekkel hasonlítottuk össze. A jelen vizsgálatban kapott  $K_A$  értékek mikromólos (a CHA esetében 10 mikromólos) nagyságrendje (3., 4. táblázat) mások eredményeihez képest magas (13. táblázat). A különbségek forrása egyrészt a használt módszerek eltérő volta lehet (Van der Graaf & Danhof, 1997; Soudijn és mtsai, 2003), másrészt nem zárható ki az FSCPX relatíve gyenge hatása sem. Elméletileg elképzelhető az is, hogy a regressziós paraméterek közötti korreláció miatt a meghatározott  $K_A$  a valósnál nagyobb értékek felé tolódott el mind az operatív, mind a Furchgott modell illesztése során, ami együtt kellett járjon a  $\tau$  értékek növekedésével illetve a q értékek csökkenésével. Az operatív modell illesztése során már felmerült ez a probléma (Van der Graaf & Stam, 1999). Valószínűtlen azonban, hogy a két, eltérő modellt illesztő módszer egymáshoz ilyen közeli (és szűk 95%-os konfidencia intervallumú) rossz eredményeket adjon (3., 4. táblázat).  $K_A$  értékeinket tehát alkalmasak tartottuk receptor rezerv meghatározására.

Agonista	Assay típus	$K_A$	Hivatkozás
CPA	funkcionális	84 nM	Dennis és mtsai, 1992
CCPA	ligandkötési	GTP-l	0.29 nM
		GTP-h	229 nM
		GTP+	530 nM
CCPA	ligandkötési assay-vel validált funkcionális	734 nM	Morey és mtsai, 1998

**13. táblázat.** A CPA és a CCPA tengerimalac pitvari  $A_1$  receptor iránti affinitását jellemző  $K_A$  értékek, melyeket a hagyományos receptorelméleten alapuló módszerekkel határoztak meg. CPA –  $N^6$ -cyclopentyladenosine; CCPA – 2-chloro- $N^6$ -cyclopentyladenosine;  $K_A$  – a félmaximális receptor okkupanciát létrehozó agonista koncentráció; GTP-l – a GTP hiányában mérhető kisebb érték; GTP-h – a GTP hiányában mérhető nagyobb érték; GTP+ – a GTP jelenlétében mérhető érték.

Az FSCPX-előkezelt csoportokban a nem inaktívált receptorhányadnak ( $q$ ) elvben ugyanakkorának kellene lennie, függetlenül az alkalmazott agonistától. A NECA esetében azonban a  $q$  értéke kb. kétszerese volt a CPA és a CHA esetén tapasztaltak (4. táblázat). A jelenséget magyarázhatja, hogy az FSCPX mások korábbi vizsgálataiban is sokszor szeszélyesnek mutatkozott. Egy vizsgálaton belül is előfordult olyan minta (tengerimalac szív), amelyben a  $q$  értéke a 0 közelében volt, más mintákat viszont ki kellett zárni a túl nagy  $q$  ( $>0.44$ ) miatt (Morey és mtsai, 1998). Mindent egybevetve, a jelen vizsgálatban ( $0.11 \leq q \leq 0.22$ ) az FSCPX a receptorok mintegy 80-90%-át inaktíválta (4. táblázat).

#### 5.2.2. Az $A_1$ receptor rezerv a szintetikus agonisták pitvari direkt negatív inotróp hatására nézve

A receptor rezerv lényege, hogy a százalékos hatás ( $E\%$ ) meghaladja a százalékos receptor okkupanciát ( $\rho\%$ ), melynek oka a receptorok agonista általi elfoglalásának – mint jelnek – az erősítése. Ennek értelmében a szintetikus agonisták  $\rho\%$  -  $E\%$  függvényeinek alakja (lineáris ábrázolásban hiperboloid, szemilogaritmikus ábrázolásban szigmoid) már

önmagában jelezi a pitvari  $A_1$  receptor downstream szignalizációjának jelerősítését (18. ábra), ami a receptor rezerv meglétének feltétele.

A receptor rezerv legegyszerűbb mutatója az ún. pharmacological shift ratio (PSR =  $K_A/EC_{50}$ ), amely a rezervet egyetlen értékkel jellemzi (Ruffolo, 1982). A szintetikus agonisták negatív inotróp hatásához tartozó PSR értékek sokszorosán meghaladják a minimálisnak vehető PSR = 1 értéket (5. táblázat). (Elvben a PSR lehet kisebb egynél, ha a  $\tau$  elég kicsi és az  $n_{op}$  elég nagy, ld.: 12. egyenlet, valamint: Black és Leff, 1983.) Az operatív és a Furchgott-féle  $K_A$  alapján számolt PSR értékek jó egyezést mutatnak, az ezek alapján felállítható receptor rezerv sorrend egyaránt: CPA>CHA>NECA. A PSR (5. táblázat) és a natív  $\tau$  (3. táblázat) értékek szintén jó egyezése a receptor rezerv szoros kapcsolatát illusztrálja az agonista hatásgeneráló képességével.

A receptor rezerv árnyaltabb jellemzője a százalékos receptor rezerv ( $RR_{\%} = E_{\%} - \rho_{\%}$ ), ami minden  $E_{\%}$  értékhez külön receptor rezerv értéket rendel (Kenakin, 1987). A  $RR_{\%}$ -et az irodalomban általában néhány konkrét  $E_{\%}$  értékhez adják meg, elsősorban a félmaximális és az ún. maximális hatáshoz. A jelen munkában a  $RR_{\%}$ -et a  $E_{\%}$  függvényében ábrázolva minden  $E_{\%}$  értékhez hozzárendeltük a hozzá tartozó  $RR_{\%}$  értéket (19. ábra). A szintetikus agonisták mindkét  $K_A$  értékéből számolt  $RR_{\%}$  értékeiről elmondható, hogy kis és közepes  $E_{\%}$  esetén (vagyis a függvény felszálló szakaszán) igen szorosan megközelítették az aszimptotikus maximális értéket. Ez igen nagy receptor rezervre utal az  $A_1$  receptor direkt negatív inotróp működését illetően (19. ábra). Ha a receptor rezervet a  $E_{\%} - RR_{\%}$  görbék maximumával jellemezzük, ugyanaz a sorrend állítható fel az agonisták között, mint a PSR alapján: CPA>CHA>NECA (5. táblázat). Legjobb tudomásunk szerint a jelen disszertáció második vizsgálati modelljének kísérletei mérték fel elsőként az  $A_1$  receptor mediálta negatív inotróp hatásra vonatkozó receptor rezervet.

### 5.2.3. A receptor rezerv hatásfüggése

A Stephenson-féle módosításig a különböző receptor elméletek sarkalatos pontja volt, hogy a maximális hatás ( $E_{\%} = 100\%$ ) eléréséhez maximális receptor okkupanciára ( $\rho_{\%} = 100\%$ ) van szükség. Miután azonban Stephenson felvetette, hogy a receptor okkupancia - hatás függvény nem feltétlen lineáris, általánossá vált a feltételezés, hogy a maximális hatás bizonyos esetekben kiváltható a receptorkészlet egy részének stimulálásával is ( $\rho_{\%} < 100\%$ )

(Ruffolo, 1982). Az agonizmus operatív modellje szűkítette a Stephenson által nyitva hagyott lehetőséget, amikor a receptor okkupancia és a hatás között szaturatív összefüggést tételezett fel, ugyanolyan jellegűt, mint ami az agonista koncentráció és a receptor okkupancia között van (Black & Leff, 1983). A receptor okkupancia - hatás kapcsolat telíthető természete azonban magában foglalja, hogy - legalábbis elvben - a maximális hatás kiváltásához mégiscsak teljes receptor okkupanciára van szükség (amint azt a 18. ábra is illusztrálja).

A gyakorlatban a high-efficacy agonistákkal végzett receptor depléciós kísérletek adatai támogatni látszanak a részleges receptor okkupáció lehetőségét a maximális hatás generálására, köztük a jelen vizsgálatok nyers  $E/c$  görbe adatai is (15., 16. és 21. ábra). A nyers  $E/c$  görbe adatok feldolgozása és elemzése után azonban úgy gondoljuk, hogy – elvben legalábbis – a maximális hatás eléréséhez bármely agonista esetén maximális receptor okkupanciára van szükség még high-efficacy full agonisták esetében is (19. ábra). A szintetikus full agonisták  $E_{\%}$  -  $RR_{\%}$  függvényeiről leolvasható, hogy nagy  $E_{\%}$  értékeknél a rezerv értéke meredeken csökken, majd  $E_{\%} = 100\%$  értéknél a görbe a  $RR_{\%} = 0$  érték felé tart (vagyis a maximális hatáshoz zérus receptor rezerv tartozik). Véleményünk szerint a nyers és a feldolgozott adatok közötti látszólagos ellentmondást a  $E_{\%}$  -  $RR_{\%}$  függvények lefutása segít feloldani (19. ábra). A full agonisták receptor rezervjének gyors kimerülése (a  $RR_{\%}$  függvények zuhanása) ugyanis olyan nagy  $E_{\%}$  értékeknél indul meg, amelyek a nyers adatok szintjén gyakorlatilag nem különíthetőek el a maximumtól. Ez tükröződik a 6. táblázat adataiban is: az FSCPX által nem inaktivált receptorhányad ( $q$ ) aktivációjára kiszámolt  $E_{\%}$  alig marad el a teljes receptorkészlet stimulációjával kiváltható  $E_{\%}$ -tól (ami definíciószerűen 100%). A különbséget a mérési hiba és a biológiai variabilitás a nyers adatok szintjén teljesen maszkolja (15., 16. ábra), a finomabb elemzés azonban felfedi (6. táblázat).

Véleményünk szerint tehát az irodalomban a maximális hatásra közölt (0-tól különböző) receptor rezerv értékek valójában közel maximális értékekre vonatkoznak, akár van erre utalás, akár nincs. Ha a jelen vizsgálat  $E_{\%}$  -  $RR_{\%}$  függvényeinek maximumát (5. táblázat) ekvivalensnek tekintjük a maximális hatásra közölt irodalmi  $RR_{\%}$  értékekkel, az eredmények összehasonlíthatóvá válnak. Az általunk a maximális (valójában 91-96%-os) negatív inotróp hatásra kapott 80-92%-os  $RR_{\%}$  értékek nagymértékben meghaladják a tengerimalac pitvari  $A_1$  receptorok más hatásokra (pl. negatív dromotrópiára) meghatározott receptor rezervjét (14. táblázat). Ez alapján érthető, hogy a jelen

vizsgálatban a szokásosnál nagyobb koncentrációban és nem rövidebb ideig alkalmazott FSCPX (12. táblázat) nem tudta szignifikánsan csökkenteni a használt full agonisták direkt negatív inotróp hatásának  $E_{max}$ -át (15., 16. ábra).

A fentiek alapján megállapíthatjuk, hogy tengerimalac pitvaron az általunk vizsgált három szintetikus full agonista a (közel) maximális direkt negatív inotróp hatásra nézve igen nagy  $A_1$  receptor rezervvel bír, amely nagyobb, mint a más hatásokra meghatározott irodalmi receptor rezerv adatok. Megállapíthatjuk továbbá, hogy egy full agonista origóból felszálló, majd lefelé fordulva az  $x = 100$ ;  $y = 0$  pont felé tartó  $E\% - RR\%$  függvényének legjellemzőbb pontja a maximuma, melyet az  $x$  és az  $y$  koordináta közösen jellemez.

Agonista	Hatás	RR% a max. hatásra	Hivatkozás
CPA	az AV csomó átvezetési idejének növelése	54	Dennis és mtsai, 1992
m-DITC-ADAC	az AV csomó átvezetési idejének növelése	10-20	Zhang és mtsai, 1997
adenozin	a $K_{ACh/Ado}$ -n folyó $K^+$ áram növelése	2	Srinivas és mtsai, 1997
	az L-típusú $Ca^{2+}$ áram csökkentése	30	
R-PIA	a $MAPD_{90}$ rövidülése	18	Morey és mtsai, 1998
CCPA		63	

**14. táblázat.** A százalékos  $A_1$  adenozin receptor rezerv ( $RR\%$ ) nagysága különböző agonistákra és különböző hatások maximumára meghatározva tengerimalac pitvaron. Mindegyik vizsgálat a hagyományos receptorelméleten alapuló assay-t alkalmazott. AV – atrioventricularis;  $K_{ACh/Ado}$  – muszkarin aktiválta  $K^+$  csatorna; m-DITC-ADAC – egy irreverzibilis  $A_1$  receptor full agonista; CPA –  $N^6$ -cyclopentyladenosine; CCPA – 2-chloro- $N^6$ -cyclopentyladenosine; R-PIA –  $R-N^6$ -(phenylisopropyl)adenosine;  $MAPD_{90}$  – a pitvari monofázisos akciós potenciál időtartama 90%-os repolarizációnál.

#### 5.2.4. Az $A_1$ receptor rezerv az adenzin pitvari direkt negatív inotróp hatására nézve

**Első próbálkozás a meghatározásra:** Az FSCPX előkezelés gyakorlatilag nem befolyásolta az adenzin E/c görbék  $E_{max}$  értékét (21., 23. ábra), hasonlóan a szintetikus  $A_1$  receptor agonisták E/c görbéinek  $E_{max}$ -ához (15., 16., 24. ábra). Az operatív és Furchgott-féle  $K_A$  értékek között azonban több nagyságrendnyi eltérést találtunk (7., 8. táblázat), ami miatt az adenzin E/c görbéket nem találtuk alkalmasnak  $K_A$  meghatározására. Ennek az a legvalószínűbb oka, hogy az adenzin, amely számos enzim és transzporter szubsztrátja, az élő szövetben igen rövid felezési idővel bír (Wilbur és Marchlinski, 1997; Pavan és IJzerman, 1998; Fredholm és mtsai, 2001). Ebből következően az adenzin szervkádbeli koncentrációja (amit a beadott dózis és a szervkád térfogata alapján számolunk, és amihez a hatást rendeljük) jelentősen eltérhet az  $A_1$  receptorok mikrokörnyezetében kialakuló koncentrációtól (ami a hatás kiváltásáért ténylegesen felelős). Emiatt funkcionális kísérlettel nehéz fiziko-kémiai korrek  $K_A$ -t meghatározni adenzin E/c görbék esetében. Emellett – az előbbiekkal összefüggésben, de az adenzin limitált vízoldékonysága miatt is – problematikus olyan magas szöveti adenzin-szintet létrehozni, amely elegendő az adenzin E/c görbék tökéletes szaturációjához (21., 23. ábra).

**Második próbálkozás a meghatározásra:** A gyors metabolikus clearance-ből fakadó nehézségek leküzdésének elfogadott módja, hogy gátolják az adenzint átalakító enzimeket és/vagy az adenzint szállító transzportereket (Szentmiklosi és mtsai, 1982; Deussen és mtsai, 1999; Ramakers és mtsai, 2008; Szentmiklosi és mtsai, 2011a). Ebből kiindulva megismételtük az adenzinnal kiváltott direkt negatív inotróp hatás  $A_1$  receptor rezervének feltárását célzó kísérleteinket NBTI jelenlétében, ami szelektív és hatékony nukleozid transzport gátló (Thorn és Jarvis, 1996). Az adenzin elimináció csökkentésével a meghatározást kívántuk megbízhatóbbá tenni.

A munkacsoport korábbi vizsgálatainak során a nukleozid transzport gátlása fokozta az adenzinra adott választ, ami az adenzin E/c görbe balra tolódásában (vagyis az  $EC_{50}$  csökkenésében) nyilvánult meg (Szentmiklosi és mtsai, 1982; Gesztelyi és mtsai, 2003a). Ezt a jelenséget az magyarázza, hogy a transzmembrán adenzin transzport eredője (megfelelő oxigenizáció mellett) a cardiomyocyták belseje felé irányul, melynek fenntartója az erőteljes intracelluláris adenzin elimináció (Deussen és mtsai, 1999; Deussen 2000a, 2000b). A nukleozid transzport blokádnak tehát – az adenzin intracelluláris



metabolizmusának kivédése révén – növeli az interstitialis adozin-szintet, ami pedig a sejtfelszíni adozin receptorok fokozott stimulációjához vezet.

Ezzel szemben a nukleozid transzport gátlása csökkentette a lassú eliminációjú adozin receptor agonisták (pl. CPA) E/c görbéjének  $E_{max}$ -át és jobbra tolták a görbét, vagyis növelték az  $EC_{50}$ -et (Gesztelyi és mtsai, 2003b; Karsai és mtsai, 2006, 2007). Ehhez a kimenetelhez az endogén adozin interstitialis koncentrációjának emelkedése vezetett, ami az adozin transzport gátlásának ismert következménye (Deussen és mtsai, 1999; Deussen 2000a, 2000b). A többlet adozin ugyanis stimulálja az adozin receptorok egy bizonyos hányadát és ezáltal elhasználja a rendszer adozinnal szembeni válaszkészségének egy részét még a E/c görbe felvétele előtt (Karsai és mtsai, 2006, 2007). Ez a jelenség azonban csak akkor szembetűnő, ha az exogén agonistát a sejtek nem (vagy csak igen lassan) eliminálják, ezáltal az exogén agonistára, miután eloszlott az extra- és intracelluláris terekben, nem fog hatni a sejtek belseje felé mutató lényeges hajtóerő. Ebben az esetben a transzmembrán transzport gátlása nemigen növeli az exogén agonista mennyiségét és ezen keresztül a sejtfelszíni adozin receptorok stimulációját.

Megdöbbenésünkre azonban az FSCPX előkezelés növelte az NBTI jelenlétében felvett adozin E/c görbék  $E_{max}$ -át (9. táblázat, 23. ábra), amit a legkevésbé vártunk volna egy irreverzibilis  $A_1$  receptor antagonistától (Srinivas és mtsai, 1996; Morey és mtsai, 1998). Ez a paradox eredmény felvetette, hogy az endogén adozin interstitialis felhalmozódása, ami az NBTI alkalmazásának egyik következménye (Deussen 2000a, 2000b; Karsai és mtsai, 2006, 2007), ebben az esetben nem hanyagolható el.

**Harmadik próbálkozás a meghatározásra:** A munkacsoport korábbi vizsgálatai során egy hatás akkor számított torzultnak, amikor egy figyelmen kívül hagyott (és általában ismeretlen) agonista koncentráció a receptorok egy részét már stimulált állapotban tartotta, amikor a kérdéses hatást kiváltotta egy másik, figyelembe vett agonista koncentráció (Gesztelyi és mtsai, 2004; Greczer és mtsai, 2010a). Ez alapján a jelen disszertáció NBTI jelenlétében felvett E/c görbéit torzultnak tekintettük.

Elméletileg a fent említett torzulás korrekciójának legjobb módja az lenne, ha meghatároznánk a figyelmen kívül hagyott agonista koncentrációt és bevonnánk a E/c adatok kiértékelésébe (az általa kiváltott hatással együtt). Napjainkig azonban nincs olyan eljárás, amellyel az interstitialis adozin koncentrációt olyan pontosan lehetne kvantifikálni, ami megfelelő lenne a mi céljainkra. A jelenlegi *in vivo* illetve *ex vivo*

módszerekkel ugyanis a működő szívizom interstitialis adenzin koncentrációját erősen módszerfüggően tudják csak meghatározni, a becslések a nanomólos koncentrációktól a mikromólosokig terjednek (Karsai és mtsai, 2006). Más lehetőség hiányában a torzult hatásokat valamilyen matematikai modell segítségével korrigálhatjuk. A mi választásunk egy a munkacsoport által kifejlesztett módszerre, az RRM-re esett, amely egy olyan helyettesítő paraméterrel szolgál számunkra, ami a mi kísérleti körülményeink között is pontosan meghatározható, méghozzá közönséges E/c görbék segítségével (Gesztelyi és mtsai, 2004; Greczer és mtsai, 2010a, 2010b). Ily módon az NBTI jelenlétében felhalmozódó többlet interstitialis adenzint az RRM segítségével meghatározott ekvieffektív CPA koncentrációval ( $c_x$ ) kvantifikáltuk, amellyel aztán korrigálni lehetett az NBTI által torzított hatás értékeket.

Az NBTI jelenlétében felvett adenzin E/c görbék hatás értékeinek korrigálásához először azokat a hatásokat határoztuk meg, amelyeket a többlet interstitialis adenzin váltott ki ( $E_{bias}$ ). Szerencsére a figyelembe vett (a E/c görbe felvételéhez használt; „teszt”) és a figyelembe nem vett („torzító”) agonistának nem kell feltétlenül azonosnak lennie (Gesztelyi és mtsai, 2004; Greczer és mtsai, 2010a, 2010b). Ebből kiindulva lehetőségünk van lassan eliminálódó adenzin receptor agonistával felvenni a E/c görbét NBTI jelenlétében, vagyis egy olyan rendszert vizsgálni, amelyben az NBTI csak az endogén adenzin interstitialis szintjének emelésén keresztül fejt ki a hatását a E/c görbére. Jelen kísérleteinkben lassan eliminálódó agonistaként CPA-t használtuk, melynek élő szövetben sokkal hosszabb a féléletideje, mint az adenzinnak (Pavan és IJerman, 1998). Először tehát az RRM segítségével meghatároztuk az NBTI hatására felhalmozódott interstitialis adenzin többlettel egyenértékű CPA koncentrációt ( $c_x$ ). Mivel a  $c_x$  nem függ az  $A_1$  receptor populáció natív vagy depletált jellegétől, ez az érték (45.08 nM CPA) érvényes mind a natív, mind az FSCPX-előkezelt pitvarokra. Ebből a CPA koncentrációból két különböző  $E_x = E_{bias}$ -t számoltunk: egyet a natív  $A_1$  receptorokkal rendelkező pitvarokra, egyet pedig az FSCPX által részlegesen inaktivált  $A_1$  receptor populációjú pitvarokra (mivel az endogén adenzin többlet hatása már függ az  $A_1$  receptor populáció állapotától). A korrekt hatásokat, amelyeket nem érint a többlet endogén adenzin torzító hatása, a torzult hatásokból (az NBTI jelenlétében felvett adenzin E/c görbék konvencionálisan kiszámolt hatás értékeikből) és a két  $E_{bias}$  értékből határoztuk meg.

A korrigált hatások azt mutatják, hogy az  $A_1$  receptorkészlet FSCPX általi deplációja valójában csökkenti az adenzin maximális direkt negatív inotróp hatását ( $E_{max}$ )

NBTI jelenlétében is, ahogy az eredetileg is várható volt (25. ábra). Az is kiderült azonban, hogy az  $E_{max}$  csökkenése meglehetősen kicsi, vagyis a tengerimalac pitvari  $A_1$  receptor rezerv az adenzin kiváltotta direkt negatív inotrópiára is igen nagy (25. ábra). Ez összhangban van a három szintetikus  $A_1$  receptor agonistával (NECA, CPA, CHA) kapott eredményekkel. Kijelenthető tehát, hogy az  $A_1$  receptort a pitvari cardiomyocyták kontraktilis rendszerével összekapcsoló jelátvitel hasonlóan nagy erősítést produkál a stabil szintetikus full agonisták és a bomlékony fiziológiás full agonista adenzin esetében.

Mivel az adenzin interstitialis koncentrációi (a nyugalmi szint és annak változásai) sajnos ismeretlenek, a korrigált értékeket csak az exogén adenzin szervkádbeli koncentrációinak függvényében tudtuk ábrázolni (25. ábra). Emiatt az adenzinra vonatkozó  $A_1$  receptor rezervet nem lehetett számszerűen meghatározni sem az operatív modellel, sem a Furchgott módszerrel. Ennek ellenére is a korrigált hatásokat mutató E/c görbék (25. ábra) egyedülállóak abban a tekintetben, hogy mentesek az endogén adenzin akkumulációjának torzító hatásától, noha az intracelluláris adenzin bontás erőteljesen akadályozva volt. Ezek a kvázi E/c görbék teljesen szaturáltak, így a maximális válaszok egyértelműen meghatározhatóak és kismértékű változásuk is jól megítélhető. Emellett a jelen vizsgálat eredményei azt is demonstrálják, hogy az adenzint átalakító enzimek és az adenzint szállító transzporterek gátlása mellett készült E/c görbék bizonyos esetekben megtévesztőek lehetnek és hibás interpretációhoz vezethetnek (23. ábra), amennyiben a torzulást nem korrigáljuk (25. ábra).

Noha az RRM elvileg minden receptor esetén alkalmazható, az  $A_1$  receptor kitüntetett helyzetben van, mivel lassan deszenzitizálódik (Mundell és Kelly, 2011) és ezáltal lehetővé teszi megbízható kumulatív E/c görbe felvételét. Gyorsan deszenzitizálódó receptor esetén az RRM nagyon pontatlan becslést ad kumulatív E/c görbével való próbálkozás esetén (Gesztelyi és mtsai, 2004), non-kumulatív E/c görbével pedig még nincs tapasztalat. Az RRM alapjául szolgáló koncepció (ld.: 14. egyenlet) azonban olyankor is hasznos lehet az eredmények interpretálásában, amikor nincs mód kvantitatív meghatározásra.

A fentiek alapján tehát megállapíthatjuk, hogy az  $A_1$  receptor mediálta direkt negatív inotróp hatásra vonatkozó receptor rezerv adenzin esetében is igen nagy. Ez a vizsgálatunk arra is felhívja a figyelmet, hogy a nukleozid transzport blokádnak egyidejűleg fejt ki potenciózó és gátló hatást az exogén adenzinnal felvett E/c görbére. A jelenség oka, hogy az NBTI kivédi az adenzin intracelluláris bontását mind az exogén, mind az

endogén adenzin esetében (Deussen és mtsai, 1999). Általánosságban az a tanulság is levonható, hogy egy endogén agonista szintjének hirtelen változása számottevően torzíthatja azt a E/c görbét, amelyet az adott rendszerben ugyanazzal az agonistával vesznek fel (illetve egy olyannal, melynek jelátviteli útjai az adott endogén agonistával jelentősen átfedést mutatnak).

#### *5.2.5. A direkt negatív inotróp hatásra vonatkozó nagy A<sub>1</sub> receptor rezerv jelentősége*

Az ischaemiás prekoncionálás jelenségét először Murry és mtsai (1986) írták le, mely szerint egy hosszú ischaemiás időszak okozta szöveti károsodás csökkenthető, ha a hosszú ischaemia elé néhány rövid ischaemiás periódust iktatnak be. Ez a típusú védelem utánozható bizonyos hatóanyagok előzetes beadásával, amit farmakológiai prekoncionálásnak neveznek (Sommerschield és Kirkeboen, 2002). A prekoncionálást az ischaemia elleni leghatékonyabb endogén kardioprotektív mechanizmusok triggerének tartják (Otani, 2008).

A myocardialis A<sub>1</sub> receptorok részt vesznek mind az ischaemiás, mind a farmakológiai prekoncionálás létrehozásában (Headrick és Lasley, 2009; Headrick és mtsai, 2011). Az A<sub>1</sub> receptor jelentőségét kiemeli, hogy agonistáinak ismételt adagolása krónikus prekoncionált állapothoz vezet, amely kivédi illetve mérsékli az ischaemia és az utána következő reperfüzió okozta szívizom kábulást (myocardial stunning), arrhythmiát, akut myocardialis infarktust és szívelégtelenséget (Dana és mtsai, 1998; Liao és mtsai, 2003; Fredholm, 2010; Laubach és mtsai, 2011). Ezek az eredmények alapot szolgáltatnak azoknak a kutatásoknak, melyek célja farmakológiailag prekoncionáló A<sub>1</sub> receptor agonisták illetve A<sub>1</sub> receptor enhancer-ek kifejlesztése, melyek terápiás értékkel rendelkezhetnek a szív ischaemiával szembeni védelme szempontjából (Elzein és Zablocki, 2008; Schenone és mtsai, 2010; Fredholm, 2010; Albrecht-Kupper és mtsai, 2012).

Az A<sub>1</sub> receptor agonisták azonban kardiális hatások széles spektrumával bírnak, melyek közül néhány nemkívánatos (bizonyos esetekben és adott mértéken felül). Ilyen a negatív kronotrópia, a negatív dromotrópia (amely egészen a harmadfokú atrioventricularis blokkig terjedhet) és a negatív inotrópia (Fredholm és mtsai, 2001; Fredholm és mtsai, 2011). A nemkívánatos hatások elkerülésére parciális A<sub>1</sub> receptor agonisták alkalmazását vetették fel, melyek kevesebb hatást váltanak ki, de azok többségükben kedvezőek (pl.

farmakológiai prekondicionálás). A parciális  $A_1$  receptor agonista CVT-3619 kifejlesztői szerint nem rendelkezik kardiovaszkuláris hatással, összhangban fejlesztésének eredeti céljával (Dhalla és mtsai, 2007). A szintén parciális  $A_1$  receptor agonista VCP28, capadenoson és CVT-2759, melyeket terápiás illetve diagnosztikus indikációban kardiológiai használatra szánják, a beszámolók szerint nem befolyásolták számottevően sem a szívfrekvenciát (Urmaliya és mtsai, 2010; Albrecht-Kupper és mtsai, 2012), sem a pitvari myocyták elektrofiziológiai paramétereit (Song és mtsai, 2002). A CVT-2759 nem érintette lényegesen a ventrikuláris myocyták kontraktilitását sem (Song és mtsai, 2002).

Mivel az elektromos aktivitás és a kamrai pumpafunkció a szív működésének legfontosabb jellemzői, a parciális  $A_1$  receptor agonistákkal foglalkozó korábbi kutatások a negatív kronotrópiára, dromotrópiára és kamrai inotrópiára fókuszáltak. Ily módon napjainkig egy vizsgálat sem foglalkozott a pitvari  $A_1$  receptor által mediált direkt negatív inotrópiával, jóllehet a pitvarok megfelelő mechanikai aktivitása segíti a diasztolés kamrai telődést, emellett pedig elejét veszi a pitvari thrombusok (vegetatio globulosa) képződésének. A jelen disszertáció második vizsgálati modellje határozta meg elsőként az  $A_1$  receptor rezervet a pitvari kontraktilitásra nézve, először könnyen tanulmányozható, stabil szintetikus agonisták felhasználásával, aztán a bomlékony fiziológiás agonistával, az adenzinnal is.

A direkt negatív inotróp hatásra vonatkozó  $A_1$  receptor rezerv megbízható mutatója a pitvari mechanikai aktivitás  $A_1$  receptor stimulációval szembeni érzékenységének. A vizsgálataink során kapott nagy  $A_1$  receptor rezerv arra utal, hogy még a kis hatáskiváltó képességű (low-efficacy)  $A_1$  receptor agonisták is gyengíthetik a pitvari kontraktilitást, legalábbis tengerimalacban. Kiindulva azonban az emberi és a tengerimalac  $A_1$  receptorok közötti nagyfokú homológiából (2. ábra), továbbá a pitvari posztreceptorális jelátviteli utak hasonlóságából (Fredholm és mtsai, 2001, 2011), a direkt negatív inotróp hatásra vonatkozó  $A_1$  receptor rezerv jelentős nagysága tengerimalacban azt sugallja, hogy a parciális  $A_1$  receptor agonisták csökkenthetik a pitvari kontrakciós erőt emberben is. (Elképzelhető, hogy ez a hatás csak azon egyéneknél jelentkezik, akik az átlagnál érzékenyebbek az  $A_1$  receptor stimulációval szemben.) Ebből következően  $A_1$  receptor agonista tulajdonságú vegyületek hosszútávú alkalmazása során érdemes lesz gondolni a pitvari mechanikai aktivitás gyengülésére, mint lehetséges mellékhatásra.

A pitvari  $A_1$  receptor rezerv meghatározását célzó vizsgálataink legfontosabb hiányossága a kísérletek tisztán funkcionális jellege. Mindazonáltal ezek a vizsgálatok

rámutattak a pitvari kontraktilitás nagyfokú érzékenységére  $A_1$  receptor agonistákkal szemben, beleértve a fiziológias ligandot, az adenzint is. Ez utóbbi jelentőségét az adja, hogy a szintetikus  $A_1$  receptor agonistákon túl számos olyan vegyület is klinikai kipróbálás alatt áll, melyek az endogén adenzin szintjét növelik illetve az endogén adenzin hatásait fokozzák ( $A_1$  receptor allosztérikus enhancer-ek) (Elzein és Zablocki 2008; Schenone és mtsai, 2010; Fredholm és mtsai, 2011; Szentmiklosi és mtsai, 2011a).

A jelen disszertáció második vizsgálati modelljének fő eredménye tehát az, hogy az irreverzibilis  $A_1$  receptor antagonistá FSCPX nem tudta a tengerimalac pitvari  $A_1$  receptor populációt olyan mértékben depletálni, ami lényegesen csökkenthette volna a vizsgált négy  $A_1$  receptor full agonista (NECA, CPA, CHA és adenzin) direkt negatív inotróp hatásának maximumát. Ez azt mutatja, hogy az  $A_1$  receptor pitvari inotrópiára konvergáló jelátviteli útvai igen nagy jelerősítésűek. Ennek megfelelően a szintetikus agonisták esetében olyan nagy  $A_1$  receptor rezerv értékeket kaptunk a direkt negatív inotróp hatásra nézve, amelyek meghaladták a mások által meghatározott  $A_1$  receptor rezerv értékeket bármely más hatásra, amelyet a tengerimalac pitvari  $A_1$  receptor mediált. Ebből következően a pitvari kontrakciós erő csökkenése az  $A_1$  receptor agonisták lehetséges mellékhatásának látszik bármely (kardiális vagy extrakardiális) indikáció esetén.

## 6. Az új eredmények összefoglalása

Első vizsgálati modellünk eredményei szerint **a tengerimalac pitvari A<sub>1</sub> receptor CPX (szelektív, ortoszerikus A<sub>1</sub> receptor antagonist) iránti affinitása hyperthyreosisban kismértékben csökken** az euthyreoid állapothoz képest. A kötőhely affinitáscsökkenése hozzájárulhat az A<sub>1</sub> receptor mediálta folyamatok jól ismert gyengüléséhez hyperthyreoid állapotban, a mérték alapján azonban valószínű, hogy ez a mechanizmus csak részben felelős a jelenségért. Azt is megállapítottuk, hogy a CPX nem csak az eu-, hanem a hyperthyreoid pitvari A<sub>1</sub> receptoron is tisztán kompetitív antagonist.

Második vizsgálati modell kísérletei során azt kaptuk, hogy az irreverzibilis A<sub>1</sub> receptor antagonist FSCPX (10 μM 45 percig, majd 75 perc mosás) nem csökkentette olyan mértékben a működőképes A<sub>1</sub> receptorok számát, ami miatt szignifikánsan csökkenne a vizsgált A<sub>1</sub> receptor full agonisták (NECA, CPA, CHA és adenozin) által kiváltott direkt negatív inotróp hatás maximuma tengerimalac bal pitvaron. Ezzel összhangban **a stabil, szintetikus A<sub>1</sub> receptor full agonisták (NECA, CPA, CHA) esetén a közel maximális direkt negatív inotróp hatáshoz tartozó A<sub>1</sub> receptor rezervre igen nagy, 80-92% közötti értékeket kaptunk**. Ezek a receptor rezerv értékek nagyobbak voltak minden korábbi irodalmi adatnál, ami az A<sub>1</sub> receptor mediálta egyéb hatásokra vonatkozott tengerimalac pitvaron. Az élő szövetben bomlékony és gyorsan kompartmentalizálódó adenozin esetében az A<sub>1</sub> receptor rezerv kvantifikálása nem sikerült, sőt az adenozin E/c görbék paradox módon viselkedtek NBTI (az adenozin intracelluláris eliminációját kivédő nukleozid transzport gátló) jelenlétében. Az NBTI miatt torzult adenozin E/c görbék matematikai korrekciója után azonban kiderült, hogy **az adenozin direkt negatív inotróp hatására vonatkozó A<sub>1</sub> receptor rezerv a szintetikus agonistákéhoz hasonlóan nagy**. Ezek az eredményeink arra utalnak, hogy a pitvari kontraktilitás igen érzékeny az A<sub>1</sub> receptor stimulációjára, ami miatt számítani kell a pitvari kontrakciós erő csökkenésére parciális A<sub>1</sub> receptor agonisták és A<sub>1</sub> receptor enhancer-ek esetében is, mint lehetséges mellékhatásra.

## 7. Summary of the findings

The main finding of our first study is that **affinity of the guinea pig atrial A<sub>1</sub> receptor towards CPX, a selective, orthosteric A<sub>1</sub> receptor antagonist, moderately decreases in hyperthyroidism** as compared to the euthyroid state. The reduced affinity of the binding site may contribute to the well-known decrease of A<sub>1</sub> receptor mediated actions in hyperthyroidism (although it is probable that this mechanism is only in part responsible for the phenomenon). In addition, we found that CPX is a pure competitive antagonist for the hyperthyroid and not only for the euthyroid atrial A<sub>1</sub> receptor.

Results of our second study show that FSCPX, an irreversible A<sub>1</sub> receptor antagonist (used in 10 μM for 45 min, followed by 75 min wash-out), failed to decrease the number of operable A<sub>1</sub> receptors in an extent that would be sufficient to significantly reduce the maximum of the direct negative inotropic effect of NECA, CPA, CHA and adenosine, four A<sub>1</sub> receptor full agonists, in guinea pig left atria. Accordingly, **A<sub>1</sub> receptor reserve has been found to be considerably great, ranging between 80-92% for the near maximal direct negative inotropic effect evoked by NECA, CPA and CHA, three stable synthetic A<sub>1</sub> receptor full agonists.** These receptor reserve values are higher than all historical values determined for any other A<sub>1</sub> receptor mediated effect in the guinea pig atrium. Quantification of A<sub>1</sub> receptor reserve failed for adenosine, a compound that is eliminated and compartmentalizes rapidly in the living tissues. Moreover, adenosine E/c curves generated in the presence of NBTI, a nucleoside transport inhibitor preventing the intracellular elimination of adenosine, seemed to behave paradoxically. However, after the mathematical correction of adenosine E/c curves biased by NBTI, it turned out that **A<sub>1</sub> receptor reserve for the direct negative inotropic effect of adenosine is similarly great as that of the synthetic agonists.** These results indicate that atrial contractility is very sensitive to the stimulation of A<sub>1</sub> receptors. Thus, a decrease in the contractile force of atria, as a possible side effect, should be considered even in the case of partial A<sub>1</sub> receptor agonists and A<sub>1</sub> receptor enhancers.



## 8. Irodalom

### 8.1. A disszertáció elkészítéséhez felhasznált irodalom

1. Abbracchio MP, Burnstock G.. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther.* 1994; 64: 445-75.
2. Albrecht-Küpper BE, Leineweber K, Nell PG. Partial adenosine A1 receptor agonists for cardiovascular therapies. *Purinergic Signal.* 2012; 8(Suppl 1): 91-9.
3. Alexander SPH, Mathie A, Peters JA. G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol.* 2011a; 164: S5-113.
4. Alexander SPH, Mathie A, Peters JA. Ligand-gated ion channels. *Br J Pharmacol.* 2011b; 164: S115-35.
5. Arunlakshana O, Schild HO. Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol Chemother.* 1959; 14: 48-58.
6. Balas N, Arad M, Rabinowitz B, Shainberg A. Modulation of cardiac A<sub>1</sub>-adenosine receptors in rats following treatment with agents affecting heart rate. *Mol Cell Biochem.* 2002; 231: 107-16.
7. Belardinelli L, Shryock JC, Song Y, Wang D, Srinivas M. Ionic basis of the electrophysiological actions of adenosine on cardiomyocytes. *FASEB J.* 1995; 9: 359-65.
8. Bindslev N. Chapter 5: Complex agonism. In: *Drug-Acceptor Interactions*. DOI: 10.3402/bindslev.2008.8; Available at: <http://journals.sfu.ca/coactionbks/index.php/Bindslev/article/view/8>.
9. Black JW, Leff P. Operational models of pharmacological agonism. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1983; 220: 141-62.
10. Bosch RF, Wang Z, Li GR, Nattel S. Electrophysiological mechanisms by which hypothyroidism delays repolarization in guinea pig hearts. *Am J Physiol.* 1999; 277: H211-20.
11. Brown JH, Goldstein D. Differences in muscarinic receptor reserve for inhibition of adenylate cyclase and stimulation of phosphoinositide hydrolysis in chick heart cells. *Mol Pharmacol.* 1986; 30: 566-70.
12. Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev.* 1972; 24: 509-81.
13. Burnstock G. Purinergic receptors. *J Theor Biol.* 1976; 62: 491-503.
14. Burnstock G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: *Cell membrane receptors for drugs and hormones: a multidisciplinary approach*. Eds.: Straub RW and Bolis L. Raven Press, New York. 1978; 107-18.

15. Burnstock G, Fredholm BB, North RA, Verkhatsky A. The birth and postnatal development of purinergic signalling. *Acta Physiol (Oxf)*. 2010; 199: 93-147.
16. Clark AJ. *General Pharmacology*. Springer, Berlin. 1937; Vol. 4.
17. Clark AJ. The antagonism of acetylcholine by atropine. *J Physiol (London)*. 1926; 61: 547-56.
18. Collis MG, Stogall SM, Martin FM. Apparent affinity of 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine for adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> receptors in isolated tissues from guinea-pigs. *Br J Pharmacol*. 1989; 97: 1274-8.
19. Colquhoun D. Binding, gating, affinity and efficacy: the interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors. *Br J Pharmacol*. 1998; 125: 924-47.
20. Colquhoun D. The quantitative analysis of drug-receptor interactions: a short history. *Trends Pharmacol Sci*. 2006; 27: 149-57.
21. Colquhoun D. Why the Schild method is better than Schild realised. *Trends Pharmacol Sci*. 2007; 28, 608-14.
22. Conant AR, Jarvis SM. Nucleoside transport in guinea-pig myocardium. *Adv Exp Med Biol*. 1991; 309A: 415-8.
23. Conant AR, Jarvis SM. Nucleoside influx and efflux in guinea-pig ventricular myocytes. Inhibition by analogues of lidoflazine. *Biochem Pharmacol*. 1994; 48: 873-80.
24. Cornfield LJ, Hu S, Hurt SD, Sills MA. [<sup>3</sup>H]2-phenylaminoadenosine ([<sup>3</sup>H]CV 1808) labels a novel adenosine receptor in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992; 263: 552-61.
25. Dana A, Baxter GF, Walker JM, Yellon DM. Prolonging the delayed phase of myocardial protection: repetitive adenosine A<sub>1</sub> receptor activation maintains rabbit myocardium in a preconditioned state. *J Am Coll Cardiol*. 1998; 31: 1142-9.
26. Danzi S, Klein I. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *Med Clin North Am*. 2012; 96: 257-68.
27. Dennis D, Jacobson K, Belardinelli L. Evidence of spare A<sub>1</sub>-adenosine receptors in guinea pig atrioventricular node. *Am J Physiol*. 1992; 262 (3Pt2): H661-71.
28. Deussen A, Stappert M, Schafer S, Kelm M. Quantification of extracellular and intracellular adenosine production: understanding the transmembranous concentration gradient. *Circulation*. 1999; 99: 2041-7.
29. Deussen A. Metabolic flux rates of adenosine in the heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2000a; 362: 351-63.
30. Deussen A. Quantitative integration of different sites of adenosine metabolism in the heart. *Ann Biomed Eng*. 2000b; 28: 877-83.

31. Dhalla AK, Shryock JC, Shreeniwas R, Belardinelli L. Pharmacology and therapeutic applications of A<sub>1</sub> adenosine receptor ligands. *Curr Top Med Chem.* 2003; 3: 369-85.
32. Dhalla AK, Santikul M, Smith M, Wong MY, Shryock JC, Belardinelli L. Antilipolytic activity of a novel partial A<sub>1</sub> adenosine receptor agonist devoid of cardiovascular effects: comparison with nicotinic acid. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007; 321: 327-33.
33. Dillmann WH. Cellular action of thyroid hormone on the heart. *Thyroid.* 2002; 12: 447-52.
34. Drury AN, Szent-Györgyi A. The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon mammalian heart. *J Physiol.* 1929; 68: 213-37.
35. El-Ani D, Jacobson KA, Shainberg A. Characterization of adenosine receptors in intact cultured heart cells. *Biochem. Pharmacol.* 1994; 48: 727-35.
36. Elzein E, Zablocki J. A<sub>1</sub> adenosine receptor agonists and their potential therapeutic applications. *Expert Opin Investig Drugs.* 2008; 17: 1901-10.
37. Fischer E. *Untersuchungen in der Puringruppe.* Springer, Berlin. 1907.
38. Franco M, Galicia O, Quintana A, Martínez F. Experimental hypothyroidism modifies specific binding of A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> analogues to adenosine receptors in the rat kidney. *Br J Pharmacol.* 2004; 142: 461-8.
39. Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.* 2001; 53: 527-52.
40. Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Linden J, Müller CE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors - an update. *Pharmacol Rev.* 2011; 63: 1-34.
41. Fredholm BB. Adenosine receptors as drug targets. *Exp Cell Res.* 2010; 316: 1284-8.
42. Furchgott RF. The use of  $\beta$ -haloalkylamines in the differentiation of receptors and in the determination of dissociation constants of receptor-agonist complexes. In: *Advances in Drug Research.* Academic Press, London. 1966; 21-55.
43. Furchgott RF, Bursztyn P. Comparison of dissociation constants and of relative efficacies of selected agonists acting on parasympathetic receptors. *Ann New York Acad Sci.* 1967; 144: 882-99.
44. Gaddum JH. The quantitative effects of antagonistic drugs. *J Physiol (London).* 1937; 89 (Suppl.): 7P-9P.
45. Gao ZG, Kim SK, IJzerman AP, Jacobson KA. Allosteric modulation of the adenosine family of receptors. *Mini Rev Med Chem.* 2005; 5: 545-53.

46. Gardner NM, Broadley KJ. Analysis of the atypical characteristics of adenosine receptors mediating negative inotropic and chronotropic responses of guinea-pig isolated atria and papillary muscles. *Br J Pharmacol.* 1999; 127: 1619-26.
47. Gesztelyi R, Zsuga J, Cseppento A, Bajza A, Varga A, Szabo JZ, Szentmiklosi AJ. Special sensitization pattern in adenosine-induced myocardial responses after thyroxine-treatment. *J Pharmacol Sci.* 2003a; 91: 295-304.
48. Gesztelyi R, Zsuga J, Hajdu P, Szabo JZ, Cseppento A, Szentmiklosi AJ. Positive inotropic effect of the inhibition of cyclic GMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE2) on guinea pig left atria in eu- and hyperthyroidism. *Gen Physiol Biophys.* 2003b; 22: 501-13.
49. Gesztelyi R, Zsuga J, Juhasz B, Der P, Vecsernyes M, Szentmiklosi AJ. Concentration estimation via curve fitting: quantification of negative inotropic agents by using a simple mathematical method in guinea pig atria. *Bull Math Biol.* 2004; 66: 1439-53.
50. Gesztelyi R, Zsuga J, Kemeny-Beke A, Varga B, Juhasz B, Tosaki A. The Hill equation and the origin of quantitative pharmacology. *Arch Hist Exact Sci.* 2012; 66: 427-38.
51. Giraldo J, Serra J, Roche D, Rovira X. Assessing receptor affinity for inverse agonists: Schild and Cheng-Prusoff methods revisited. *Curr Drug Targets.* 2007; 8: 197-202.
52. Giraldo J, Vivas NM, Vila E, Badia A. Assessing the (a)symmetry of concentration-effect curves: empirical versus mechanistic models. *Pharmacol Ther.* 2002; 95: 21-45.
53. Grencher M, Pinter A, Zsuga J, Kemeny-Beke A, Juhasz B, Szodoray P, Tosaki A, Gesztelyi R. The influence of affinity, efficacy, and slope factor on the estimates obtained by the receptorial responsiveness method (RRM): a computer simulation study. *Can J Physiol Pharmacol.* 2010a; 88: 1061-73.
54. Grencher M, Zsuga J, Majoros L, Pinter A, Kemeny-Beke A, Juhasz B, Tosaki A, Gesztelyi R. Effect of asymmetry of concentration-response curves on the results obtained by the receptorial responsiveness method (RRM): an in silico study. *Can J Physiol Pharmacol.* 2010b; 88: 1074-83.
55. Gupta RC, Neumann J, Watanabe AM. Comparison of adenosine and muscarinic receptor-mediated effects on protein phosphatase inhibitor-1 activity in the heart. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993; 266: 16-22.
56. Headrick JP, Hack B, Ashton KJ. Acute adenosinergic cardioprotection in ischemic-reperfused hearts. *Am J Physiol.* 2003; 285: H1797-818.
57. Headrick JP, Lasley RD. Adenosine receptors and reperfusion injury of the heart. *Handb Exp Pharmacol.* 2009; (193): 189-214.
58. Headrick JP, Peart JN, Reichelt ME, Haseler LJ. Adenosine and its receptors in the heart: regulation, retaliation and adaptation. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1808: 1413-28.

59. Hill AV. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol (London)*. 1910; 40: Proceedings iv-vii.
60. IJzerman AP, Fredholm BB, Frenguelli BG, Jacobson KA, Linden J, Schwabe U, Stiles GL, Hills R. Adenosine receptors. IUPHAR database. Utolsó módosítás: 2012. november 7. Letöltve: <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyMenuForward?familyId=3>
61. Kaasik A, Minajeva A, Paju K, Eimre M, Seppet EK. Thyroid hormones differentially affect sarcoplasmic reticulum function in rat atria and ventricles. *Mol Cell Biochem*. 1997a; 176: 119-26.
62. Kaasik A, Paju K, Vetter R, Seppet EK. Thyroid hormones increase the contractility but suppress the effects of beta-adrenergic agonist by decreasing phospholamban expression in rat atria. *Cardiovasc Res*. 1997b; 35: 106-12.
63. Kaasik A, Seppet EK, Ohisalo JJ. Enhanced negative inotropic effect of an adenosine A<sub>1</sub>-receptor agonist in rat left atria in hypothyroidism. *J Mol Cell Cardiol*. 1994; 26: 509-17.
64. Karsai D, Gesztelyi R, Zsuga J, Jakab A, Szendrei L, Juhasz B, Bak I, Szabo G, Lekli I, Vecsernyes M, Varga E, Szentmiklosi AJ, Tosaki A. Influence of hyperthyroidism on the effect of adenosine transport blockade assessed by a novel method in guinea pig atria. *Cell Biochem Biophys*. 2007; 47: 45-52.
65. Karsai D, Zsuga J, Juhasz B, Der P, Szentmiklosi AJ, Tosaki A, Gesztelyi R. Effect of nucleoside transport blockade on the interstitial adenosine level characterized by a novel method in guinea pig atria. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006; 47: 103-9.
66. Katz B. Archibald Vivian Hill, 26 September 1886 – 3 Jun 1977. *Biogr Mem Fellows R Soc*. 1978; 24: 71-149.
67. Katzung BG (Ed.). *Basic & clinical pharmacology*. Eighth international edition. Lange, 2001.
68. Kenakin TP. *A pharmacology primer: theory, applications, and methods*. Elsevier Academic Press, 2009; 22-23, 35-36.
69. Kenakin, TP. *Pharmacologic Analysis of Drug-Receptor Interaction*. Raven Press, New York, 1987; 1-29.
70. Kiss E, Jakab G, Kranias EG, Edes I. Thyroid hormone-induced alterations in phospholamban protein expression. Regulatory effects on sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> transport and myocardial relaxation. *Circ Res*. 1994; 75: 245-51.
71. Kreuzberg U, Theissen P, Schicha H, Schroder F, Mehlhorn U, de Vivie ER, Boknik P, Neumann J, Grohe C, Herzig S. Single-channel activity and expression of atrial L-type Ca<sup>2+</sup> channels in patients with latent hyperthyroidism. *Am J Physiol*. 2000; 278: H723-30.

72. Kurachi Y, Nakajima T, Sugimoto T. On the mechanism of activation of muscarinic potassium channels by adenosine in isolated atrial cells: Involvement of GTP-binding proteins. *Pflügers Arch.* 1986; 407: 264-74.
73. Langmuir I. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *J Am Chem Soc.* 1918; 40: 1361-403.
74. Laubach VE, French BA, Okusa MD. Targeting of adenosine receptors in ischemia-reperfusion injury. *Expert Opin Ther Targets.* 2011; 15: 103-18.
75. Lazareno S, Birdsall NJ. Estimation of competitive antagonist affinity from functional inhibition curves using the Gaddum, Schild and Cheng-Prusoff equations. *Br J Pharmacol.* 1993; 109: 1110-9.
76. Leff P. The two-state model of receptor activation. *Trends Pharmacol Sci.* 1995; 16: 89-97.
77. Liao Y, Takashima S, Asano Y, Asakura M, Ogai A, Shintani Y, Minamino T, Asanuma H, Sanada S, Kim J, Ogita H, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M. Activation of adenosine A<sub>1</sub> receptor attenuates cardiac hypertrophy and prevents heart failure in murine left ventricular pressure-overload model. *Circ Res.* 2003; 93: 759-66.
78. Manjunath S, Sakhare PM. Adenosine and adenosine receptors: Newer therapeutic perspective. *Indian J Pharmacol.* 2009; 41: 97-105.
79. Mathôt RA, Appel S, van Schaick EA, Soudijn W, IJzerman AP, Danhof M. High-performance liquid chromatography of the adenosine A<sub>1</sub> agonist N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine and the A<sub>1</sub> antagonist 8-cyclopentyltheophylline and its application in a pharmacokinetic study in rats. *J Chromatogr.* 1993; 620: 113-20.
80. Morey TE, Belardinelli L, Dennis DM. Validation of Furchgott's method to determine agonist-dependent A<sub>1</sub>-adenosine receptor reserve in guinea-pig atrium. *Br J Pharmacol.* 1998; 123: 1425-33.
81. Motulsky HJ, Christopoulos A. *Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting.* GraphPad Software Inc., San Diego. 2004; Online version: <http://www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf>
82. Mundell S, Kelly E. Adenosine receptor desensitization and trafficking. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1808: 1319-28.
83. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986; 74: 1124-36.
84. Müller CE, Jacobson KA. Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1808: 1290-308.
85. Nabbout LA, Robbins RJ. The cardiovascular effects of hyperthyroidism. *Methodist Debaquey Cardiovasc J.* 2010; 6: 3-8.
86. Neal MJ. *Rövid farmakológia.* B+V Lap- és Könyvkiadó kft. 2000; 10-11.

87. Neubig RR, Spedding M, Kenakin T, Christopoulos A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol Rev.* 2003; 55: 597-606.
88. Neumann J, Gupta RC, Jones LR, Bodor GS., Bartel S, Krause EG, Pask HT, Schmitz W, Scholz H, Watanabe AM. Interaction of beta-adrenoceptor and adenosine receptor agonists on phosphorylation. Identification of target proteins in mammalian ventricles. *J Mol Cell Cardiol.* 1995; 27: 1655-67.
89. Ojamaa K, Klein I, Sabet A, Steinberg SF. Changes in adenylyl cyclase isoforms as a mechanism for thyroid hormone modulation of cardiac beta-adrenergic receptor responsiveness. *Metabolism.* 2000a; 49: 275-9.
90. Ojamaa K, Kenessey A, Klein I. Thyroid hormone regulation of phospholamban phosphorylation in the rat heart. *Endocrinology.* 2000b; 141: 2139-44.
91. Otani H. Ischemic preconditioning: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 2008; 10: 207-47.
92. Pantos C, Mourouzis I, Cokkinos DV. New insights into the role of thyroid hormone in cardiac remodeling: time to reconsider? *Heart Fail Rev.* 2011; 16: 79-96.
93. Pavan B, IJzerman AP. Processing of adenosine receptor agonists in rat and human whole blood. *Biochem Pharmacol.* 1998; 56: 1625-32.
94. Pietras RJ, Real MA, Poticha GS, Bronsky D, Waldstein SS. Cardiovascular response in hyperthyroidism. The influence of adrenergic-receptor blockade. *Arch Intern Med.* 1972; 129: 426-9.
95. Ramakers BP, Pickkers P, Deussen A, Rongen GA, van den Broek P, van der Hoeven JG, Smits P, Riksen NP. Measurement of the endogenous adenosine concentration in humans in vivo: methodological considerations. *Curr Drug Metab.* 2008; 9: 679-85.
96. Ranasinghe AM, Bonser RS. Thyroid hormone in cardiac surgery. *Vascul Pharmacol.* 2010; 52: 131-7.
97. Robeva AS, Woodard RL, Jin XW, Gao ZH, Bhattacharya S, Taylor HE, Rosin DL, Linden J. Molecular characterization of recombinant human adenosine receptors. *Drug Dev Res.* 1996; 39: 243-52.
98. Rubinstein I, Binah O. Thyroid hormone modulates membrane currents in guinea-pig ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1989; 340: 705-11.
99. Ruffolo RR Jr. Review important concepts of receptor theory. *J Auton Pharmacol.* 1982; 2: 277-95.
100. Sakaguchi Y, Cui G, Sen L. Acute effects of thyroid hormone on inward rectifier potassium channel currents in guinea pig ventricular myocytes. *Endocrinology.* 1996; 137: 4744-51.
101. Schenone S, Brullo C, Musumeci F, Bruno O, Botta M. A<sub>1</sub> receptors ligands: past, present and future trends. *Curr Top Med Chem.* 2010; 10: 878-901.

102. Schild HO. pA, a new scale for the measurement of drug antagonism. *Br J Pharmacol.* 1947; 2: 189-206.
103. Shenoy R, Klein I, Ojamaa K. Differential regulation of SR calcium transporters by thyroid hormone in rat atria and ventricles. *Am J Physiol.* 2001; 281: H1690-6.
104. Shimoni Y, Banno H. Thyroxine effects on temperature dependence of ionic currents in single rabbit cardiac myocytes. *Am J Physiol.* 1993; 265: H1875-83.
105. Smolenski RT, Yacoub MH, Seymour AM. Hyperthyroidism increases adenosine transport and metabolism in the rat heart. *Mol Cell Biochem.* 1995; 143: 143-9.
106. Sommerschild HT, Kirkebøen KA. Adenosine and cardioprotection during ischaemia and reperfusion – an overview. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2000; 44: 1038-55.
107. Sommerschild HT, Kirkebøen KA. Preconditioning - endogenous defence mechanisms of the heart. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2002; 46: 123-37.
108. Song Y, Wu L, Shryock JC, Belardinelli L. Selective attenuation of isoproterenol-stimulated arrhythmic activity by a partial agonist of adenosine A<sub>1</sub> receptor. *Circulation.* 2002; 105: 118-23.
109. Soudijn W, van Wijngaarden I, IJzerman AP. Medicinal chemistry of adenosine A<sub>1</sub> receptor ligands. *Curr Top Med Chem.* 2003; 3: 355-67.
110. Srinivas M, Shryock JC, Dennis DM, Baker SP, Belardinelli L. Differential A<sub>1</sub> adenosine receptor reserve for two actions of adenosine on guinea pig atrial myocytes. *Mol Pharmacol.* 1997; 52: 683-91.
111. Srinivas M, Shryock JC, Scammells PJ, Ruble J, Baker SP, Belardinelli L. A novel irreversible antagonist of the A<sub>1</sub>-adenosine receptor. *Mol Pharmacol.* 1996; 50: 196-205.
112. Sunagawa M, Yamakawa M, Shimabukuro M, Higa N, Takasu N, Kosugi T. Electrophysiologic characteristics of atrial myocytes in levo-thyroxine-treated rats. *Thyroid.* 2005; 15: 3-11.
113. Szentmiklosi AJ, Cseppento A, Szabo JZ, Nosztray K, Szegi J. Myocardial and vascular actions of purinoceptor activators are reduced after thyroxine treatment. *Pharmacol Res.* 1992; 25(Suppl. 2): 171-2.
114. Szentmiklosi AJ, Cseppento A, Harmati G, Nanasi PP. Novel trends in the treatment of cardiovascular disorders: site- and event- selective adenosinergic drugs. *Curr Med Chem.* 2011a; 18: 1164-87.
115. Szentmiklosi AJ, Cseppento A, Gesztelyi R, Zsuga J, Kortvély A, Harmati G, Nanasi PP. Xanthine derivatives in the heart: blessed or cursed? *Curr Med Chem.* 2011b; 18: 3695-706.
116. Szentmiklosi AJ, Nemeth M, Cseppento A, Szegi J, Papp JG, Szekeres L. Potentiation of the myocardial actions of adenosine in the presence of coformycin, a specific inhibitor of adenosine deaminase. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1982; 256: 236-52.



117. Tawfik-Schlieper H, Klotz KN, Kreye VA, Schwabe U. Characterization of the K(+)-channel-coupled adenosine receptor in guinea pig atria. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1989; 340: 684-8.
118. Tesmer JJ, Dessauer CW, Sunahara RK, Murray LD, Johnson RA, Gilman AG, Sprang SR. Molecular basis for P-site inhibition of adenylyl cyclase. *Biochemistry.* 2000; 39: 14464-71.
119. Thorn JA, Jarvis SM. Adenosine transporters. *Gen Pharmacol.* 1996; 27: 613-20.
120. Urmaliya VB, Pouton CW, Devine SM, Haynes JM, Warfe L, Scammells PJ, White PJ. A novel highly selective adenosine A<sub>1</sub> receptor agonist VCP28 reduces ischemia injury in a cardiac cell line and ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts at concentrations that do not affect heart rate. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2010; 56: 282-92.
121. Van der Graaf PH, Danhof M. On the reliability of affinity and efficacy estimates obtained by direct operational model fitting of agonist concentration-effect curves following irreversible receptor inactivation. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 1997; 38: 81-5.
122. Van der Graaf PH, Stam WB. Analysis of receptor inactivation experiments with the operational model of agonism yields correlated estimates of agonist affinity and efficacy. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 1999; 41: 117-25.
123. Watanabe H, Washizuka T, Komura S, Yoshida T, Hosaka Y, Hatada K, Aizawa Y, Chinushi M, Yamamoto T, Ma M, Watanabe K. Genomic and non-genomic regulation of L-type calcium channels in rat ventricle by thyroid hormone. *Endocr Res.* 2005; 31: 59-70.
124. Waud DR, Son SL, Waud BE. Kinetic and empirical analysis of dose-response curves illustrated with a cardiac example. *Life Sci.* 1978; 22: 1275-85.
125. Weiss JN. The Hill equation revisited: uses and misuses. *FASEB J.* 1997; 11: 835-41.
126. WHO (World Health Organization), Global Health Observatory: [http://www.who.int/gho/mortality\\_burden\\_disease/causes\\_death\\_2008/en/index.html](http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death_2008/en/index.html) (a felső oszlopdiagramm alatti „View date”-re kattelve tölthető le az az Exel file, melynek adataiból az 1. ábra kördiagrammjai készültek; letöltve 2012. augusztus 21.)
127. Wilbur SL, Marchlinski FE. Adenosine as an antiarrhythmic agent. *Am J Cardiol.* 1997; 79: 30-7.
128. Wilken A, Tawfik-Schlieper H, Klotz KN, Schwabe U. Pharmacological characterization of the adenylyl cyclase-coupled adenosine receptor in isolated guinea pig atrial myocytes. *Mol Pharmacol.* 1990; 37: 916-20.
129. Wyllie DJ, Chen PE. Taking the time to study competitive antagonism. *Br J Pharmacol.* 2007; 150: 541-51.
130. Zhang J, Belardinelli L, Jacobson KA, Otero DH, Baker SP. Persistent activation by and receptor reserve for an irreversible A<sub>1</sub>-adenosine receptor agonist in DDT1 MF-2 cells and in guinea pig heart. *Mol Pharmacol.* 1997; 52: 491-8.

Iktatószám: DEENKÉTK/197/2013.  
Tételszám:  
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Kiss Zsuzsanna Mária

Neptun kód: P2MTRL

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Gesztelyi, R., Kiss, Z., Wachal, Z., Juhász, B., Bombicz, M., Csépanyi, E., Pak, K., Zsuga, J., Papp, C., Galajda, Z., Branzaniuc, K., Pórszász, R., Szentmiklósi, J.A., Tósaki, Á.: The surmountable effect of FSCPX, an irreversible A1 adenosine receptor antagonist, on the negative inotropic action of A1 adenosine receptor full agonists in isolated guinea pig left atria.  
*Arch. Pharm. Res. Epub ahead of print (2013)*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12272-013-0056-z>  
IF:1.592 (2011)
2. Kiss, Z., Pak, K., Zsuga, J., Juhász, B., Varga, B., Szentmiklósi, J.A., Haines, D.D., Tósaki, Á., Gesztelyi, R.: The guinea pig atrial A1 adenosine receptor reserve for the direct negative inotropic effect of adenosine.  
*Gen. Physiol. Biophys. "accepted by publisher", 2013.*  
DOI: [http://dx.doi.org/10.4149/gpb\\_2013041](http://dx.doi.org/10.4149/gpb_2013041)  
IF:1.192 (2011)
3. Gesztelyi, R., Kiss, Z., Zsuga, J., Pak, K., Papp, C., Galajda, Z., Branzaniuc, K., Szentmiklósi, J.A., Tósaki, Á.: Thyroid hormones decrease the affinity of 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (CPX), a competitive antagonist, for the guinea pig atrial A(1) adenosine receptor.  
*Gen. Physiol. Biophys. 31 (4), 389-400, 2012.*  
DOI: [http://dx.doi.org/10.4149/gpb\\_2012\\_043](http://dx.doi.org/10.4149/gpb_2012_043)  
IF:1.192 (2011)



Összesített impakt faktor: 3.976

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 3.976

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2013.05.22



## 9. Tárgyszavak

**Magyar tárgyszavak:** A<sub>1</sub> adenzin receptor, affinitás, pajzsmirigyhormonok, Schild módszer, Furchgott módszer, operatív modell, receptoriális válaszkészség módszer, receptor rezerv, inotrópia, CPA, CPX, FSCPX, NBTI, pitvar, tengerimalac

**Angol tárgyszavak:** A<sub>1</sub> adenosine receptor, affinity, thyroid hormones, Schild analysis, Furchgott's method, operational model, receptorial responsiveness method, receptor reserve, inotropy, CPA, CPX, FSCPX, NBTI, atrium, guinea pig

## 10. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki Dr. Tósaki Árpád egyetemi tanárnak (DEOEC GYTK Gyógyszerhatástani Tanszék), hogy lehetővé tette munkám elvégzését az általa vezetett tanszéken.

Köszönöm témavezetőm, Dr. Gesztelyi Rudolf egyetemi adjunktus (DEOEC GYTK Gyógyszerhatástani Tanszék) segítségét munkám során.

Köszönöm Dr. Szentmiklósi József egyetemi docensnek (DEOEC ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet), hogy kísérletes munkámat részben az általa vezetett Keringésfarmakológiai Laboratóriumban végezhettem.

A munka anyagi háttérét a következő pályázatok biztosították: OTKA-K 72315; TAMOP-4.2.2-08/1-2008-0007; TAMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007; TAMOP-4.2.2./B-10/1-2010-0024; TAMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045; TAMOP-4.2.4. A/2-11-1-2012-0001; POSDRU/89/1.5/S/ 60782 .

Nemzeti Fejlesztési Ügynökség  
[www.ujszachenyiterv.gov.hu](http://www.ujszachenyiterv.gov.hu)  
**06 40 638 638**



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

## **11. Fűggelék**