

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Az A₁ adenosin 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

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Az A₁ 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

Az A₁ adenozin receptor tiroxinnal szembeni érzékenységének és a direkt negatív inotróp hatáshoz tartozó receptor rezervjének meghatározása tengerimalac pitvaron

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

Írta: Dr. Kiss Zsuzsanna gyógyszerész

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

Témavezető: Dr. Gesztelyi Rudolf, Ph.D.

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora
tagok: Dr. Bíró Tamás, az MTA doktora
Dr. Csont Tamás, Ph.D.

A doktori szigorlat helye és időpontja:

DEOEC Gyógyszerhatástani Tanszék könyvtára, 2013. október 2. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Benkő Ilona, Ph.D.
Prof. Dr. Pethő Gábor, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora
tagok: Dr. Bíró Tamás, az MTA doktora
Dr. Csont Tamás, Ph.D.
Dr. Benkő Ilona, Ph.D.
Prof. Dr. Pethő Gábor, Ph.D.

Az értekezés védésének helye és időpontja:

DEOEC I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterme, 2013. október 2. 13 óra

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzés.....	1
2. Anyagok és módszerek	4
2.1. Vegyszerek és oldatok	4
2.2. Állatok és preparátumok.....	4
2.3. Kísérleti protokollok és csoportok	5
2.4. Az A_2 illetve K_B meghatározása.....	7
2.5. A K_A meghatározása.....	8
2.6. A receptor rezerv kvantifikálása.....	8
2.7. A CPA koncentráció-hatás görbék NBTI okozta torzulásának kvantifikálása.....	9
2.8. Az NBTI jelenlétében felvett adenosin koncentráció-hatás görbék hatás értékeinek korrekciója	9
2.9. Alkalmazott egyenletek	10
2.10. Adatelemzés.....	13
3. Eredmények.....	14
3.1. Az A_1 adenosin receptor CPX iránti affinitásának változása 8 napos tiroxin-kezelés után.....	14
3.2. A pitvari direkt negatív inotrópia A_1 adenosin receptor rezervje	15
4. Megbeszélés	18
4.1. A tengerimalac pitvari A_1 adenosin receptor CPX iránti affinitásának változása 8 napos tiroxin-kezelés után	18
4.2. A direkt negatív inotróp hatás A_1 adenosin receptor rezervje tengerimalac pitvaron.....	19
5. Az új eredmények összefoglalása	23
6. A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények.....	24
7. Absztraktok.....	26
8. Köszönetnyilvánítás.....	27

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. A keringési rendszer betegségei többségükben a nagyvérkeringési artériák atherosclerosisára vezethetőek vissza, ami általában érinti a szívet ellátó koszorúsereket is. Ennek következtében az ischaemiás szívbetegség az egyik vezető halálok a jobb életszínvonalon élők számára.

Érdekes fejlemény ugyanakkor, hogy a legfejlettebb országokban a kardiovaszkuláris betegségek (és ezeken belül az ischaemiás szívbetegség) aránya csökkenni kezdett a többi halálokokhoz képest, 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.

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 adenzin, amely protektív és reparatív folyamatokat iniciál az ischaemiának kitett myocardiumban. Ezek farmakológiai befolyásolhatósága világszerte a kutatás élvonalában van.

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.

Régről ismert a pajzsmirigy 3,3',5-triiodo-L-tironin (T_3) és L-tiroxin (T_4) hormonjainak hatása a keringési rendszerre és azon belül is a szív adenzinerg rendszerére. 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. 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. 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 vizsgálatainknak két fő célja volt:

1. Fel kívántuk deríteni, hogy a tiroxin-kezelés megváltoztatja-e a pitvari A_1 receptor ortoszterikus 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. (Receptor rezervról akkor beszélünk, ha hatás maximális értékhez képesti százaléka nagyobb, mint az ezt kiváltó receptor okkupancia maximális értékhez képesti százaléka.) Mivel a receptor rezerv konkrét értéke függ az agonistától is, a vizsgálathoz többféle ligandot használtunk: három stabil szintetikus agonistát, továbbá a bomlékony fiziológiás 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.

2. Anyagok és módszerek

2.1. Vegyszerek és oldatok

Az általunk használt vegyszerek: Na-levotiroxin pentahidrát (T_4 , tiroxin), NECA (5'-(N-ethylcarboxamido)adenosine), CPA (N^6 -cyclopentyladenosine), CHA (N^6 -cyclohexyladenosine), CPX (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine), FSCPX (8-cyclopentyl- N^3 -[3-(4-(fluorosulfonyl)benzoyloxy)propyl]- N^1 -propylxanthine), NBTI (S-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine), adenzin (Sigma). A preparátumok tápoldata végig 36 °C-os Krebs oldat volt (NaCl: 118 mM, KCl: 4.7 mM, $CaCl_2$: 2.5 mM, NaH_2PO_4 : 1 mM, $MgCl_2$: 1.2 mM, $NaHCO_3$: 24.9 mM, glükóz: 11.5 mM, aszkorbinsav: 0.1 mM).

2.2. Állatok és preparátumok

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

In vivo tiroxin-kezelés

Az első vizsgálati modellben résztvevő állatok egyik része napi 330 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Na L-tiroxin pentahidrátot kapott 8 napon keresztül ip., míg a többi állat 8 napon át a tiroxin oldószerét kapta ip.. Az állatokat a kilencedik napon használtuk fel.

A bal pitvarok preparálása

A dekapitált állatokból kivágott bal pitvarokat 10 mN nyugalmi feszülés mellett Krebs-oldatot tartalmazó 10 ml-es szervkádakban (TSZ-04, Experimetria,

Budapest) függesztettük fel. A Krebs-oldatot karbogénnel (95% O₂ és 5% CO₂) szellőztettük (pH=7,4; 36 °C). A pitvarok platinaelektródon keresztüli pontszerű ingerlését a felfüggesztés után azonnal megkezdjük egybeépített programozható stimulátor (ST-02, Experimetria, Budapest) és erősítő (PST-02, Experimetria, Budapest) segítségével a küszöb feszültség 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.

2.3. Kísérleti protokollok és csoportok

Az A₁ adenzin receptor CPX iránti affinitásának vizsgálata

1. protokoll: Az oldószer-kezelt (S) és tiroxin-kezelt (T) csoportok pitvarai (az 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 koncentráció-hatás (E/c) görbét vettünk fel rajtuk adenzinnal (*S1 Kontroll görbe*). Ezt követően 15 perces mosás következett, 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*).

2. protokoll: 40-45 perces inkubációt követően először minden pitvaron felvettünk egy kumulatív adenzin E/c görbét. Ezután 15 perc mosás következett, majd 20 perc *in vitro* kezelés jött a következő elrendezésben: a két kontroll csoport pitvarai 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 külön kontroll illetve CPX-kezelt csoportok kerültek kialakításra.)

Az FSCPX tulajdonságainak vizsgálata izolált pitvaron

40-45 perces Krebs-oldatban való inkubáció után a pitvarokon kumulatív E/c görbét vettünk fel adenzinnal. 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.

Az A₁ adenzin receptor rezerv vizsgálata NECA-val, CPA-val és CHA-val

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 A₁ receptor agonistával.

Az A₁ adenzin receptor rezerv vizsgálata adenzinnal: első próbálkozás

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*).

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*).

9. protokoll: 40-45 perc Krebs-oldatban való inkubáció után a pitvarokon kumulatív E/c görbét vettünk fel adenzinnal. 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.

2.4. Az A₂ illetve K_B meghatározása

A Schild egyenletet globálisan illesztettük az 1. és 2. protokoll görbecsaládjainak átlagolt adataira (az átlagolás kiegyenlíti az egyedi görbék biológiai variabilitását és a mérési hibákat, ami növeli a kapott regressziós

paraméterek megbízhatóságát). 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.

2.5. A K_A meghatározása

Az operatív modell egyenletét globális illesztettük a 6. és 7. protokoll görbecsaládjainak átlagolt adataira megosztott E_m , K_A és n_{op} paraméterek mellett (a τ lehetett eltérő). A kapott K_A értékeket operatív K_A -nak neveztük.

A Furchgott módszerhez ugyanazon E/c görbék adatait dolgoztuk fel, mint az operatív módszerhez. Az átlagolt E/c görbék empirikus paraméterei (E_{max} , EC_{50} , n) alapján 12 általunk kiválasztott hatás értékhez kiszámoltuk a kiváltó koncentrációkat a Hill egyenlet segítségével. Az azonos agonistához és azonos hatáshoz tartozó koncentrációkat párokba rendeztük, majd ábrázoltuk az intakt receptorokhoz tartozó koncentrációkat a depletált receptorállományhoz tartozó koncentrációk logaritmusának függvényében. Az így kapott görbékre Furchgott egyenletét illesztettük, a K_A értékeket Furchgott-féle K_A -nak neveztük.

2.6. A receptor rezerv kvantifikálása

A százalékos receptor okkupancia ($\rho\%$) meghatározható az agonista koncentrációból és a K_A -ból, míg a százalékos hatást ($E\%$) a maximális hatás százalékában kifejezett hatásként értelmeztük. Kifejeztük a $\rho\%$ és a $E\%$ kapcsolatát is.

A receptor rezervet egyrészt a PSR-rel (pharmacological shift ratio; K_A/EC_{50}) jellemeztük, másrészt kifejeztük százalékos formában is ($RR\% = E\% -$

$\rho\%$). A százalékos receptor rezervet mindhárom szintetikus agonistára meghatároztuk mindkét eredetű K_A -ból, majd ábráztuk a százalékos hatás függvényében.

2.7. A CPA koncentráció-hatás görbék NBTI okozta torzulásának kvantifikálása

Az NBTI jelenlétében felvett és konvencionálisan számolt hatás értékekkel ábrázolt E/c görbéinket torzultnak tekintettük, ahol is a torzító agonista koncentráció az endogén adenzin interstitialis koncentráció-növekménye volt, ami a nukleozid transzport gátlásának hatására alakult ki. Mivel a CPA lassan eliminálódik az általunk használt kísérleti rendszerből, a CPA pitvari sejtekbe való felvételének NBTI általi gátlása nem növeli számottevően a CPA koncentrációját az A_1 receptorok sejt felszíni kötőhelyének környezetében. Emiatt a natív és NBTI jelenlétében felvett CPA E/c görbék közötti különbség oka döntően az a hatás, melyet az endogén adenzin-többlet fejt ki. Ebből kiindulva az NBTI hatására felhalmozódott interstitialis adenzint az ekvieffektív CPA koncentrációval (c_x) kvantifikáltuk oly módon, hogy az RRM egyenletét 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).

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

Az NBTI jelenlétében felvett adenzin E/c görbék torzulásának meghatározása a 9. protokoll átlagolt CPA E/c görbéiből nyert c_x segítségével történt. Feltételeztük, hogy az endogén adenzin-többlet ugyanakkora az intakt

és az FSCPX-előkezelt pitvarokon, ezért az intakt pitvarokon kapott c_x -et használtuk fel mind a P8 NBTI görbe, mind a P8 FSCPX+NBTI görbe korrekciójához. Figyelembe vettük ugyanakkor, hogy a c_x -szel ekvielektív torzító adenzin koncentráció eltérő hatást fejt ki 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). Amikor a P8 NBTI görbét korrigáltuk, a P9 Kontroll csoport átlagolt CPA E/c görbéjének empirikus paramétereit használtuk fel a c_x mellett, amikor pedig a P8 FSCPX+NBTI görbe került korrekcióra, a c_x mellett a P6 FSCPX csoport átlagolt CPA E/c görbéjének empirikus paramétereit használtuk.

A 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 torzulás nélkül vizsgáljuk.

2.9. Alkalmazott egyenletek

Hill egyenlet

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

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).

Schild egyenlet

$$E = E_{\max} \cdot \frac{c^n}{c^n + \left(EC_{50}^* \cdot \left(1 + \left(\frac{[B]}{A_2} \right)^s \right) \right)^n}$$

ahol: c , E , E_{\max} és n – a Hill egyenlet paraméterei; EC_{50}^* – a félhatásos agonista koncentráció az antagonistá hiányában (szintén a Hill egyenlet paramétere); $[B]$ – az antagonistá koncentrációja; S – a Schild koefficiens; A_2 – az az antagonistá koncentráció, amely megduplázza az agonista E/c görbéjének félhatásos koncentrációját ($EC_{50} = 2 \cdot EC_{50}^*$). Ha $S = 1$, akkor $A_2 = K_B$ (mely utóbbi az antagonistá-receptor komplex egyensúlyi disszociációs állandója).

Az agonizmus operatív modelljének egyenlete

$$E = E_m \cdot \frac{(c \cdot \tau)^{n_{op}}}{(c \cdot \tau)^{n_{op}} + (c + K_A)^{n_{op}}}$$

ahol: c – az agonista koncentrációja; K_A – az agonista-receptor komplex egyensúlyi disszociációs állandója; E_m – az adott rendszerben elérhető maximális hatás; n_{op} – az operatív slope faktor; τ – az operatív hatékonyság (az agonista hatáslétrehozó képességének mértéke).

Furchgott egyenlete

$$c = \frac{K_A \cdot c' \cdot q}{K_A + c' \cdot (1 - q)}$$

ahol: c – a natív E/c görbéhez tartozó agonista koncentráció; c' – a depletált receptorkészletű 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 rendszerben.

A receptoriális válaszkésztség módszer (RRM) egyenletei

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

ahol: E' – a torzult hatás (melyet a teszt agonistának tulajdonítunk, de valójában a teszt agonista és a torzító agonista közösen létrehozott hatása); E – a torzítatlan hatás (a teszt agonista és a torzító agonista korrekt kiértékeléssel kapott közös hatása); E_{bias} – az hatás, amelyet a torzító agonista önmagában hoz létre (a torzulás oka).

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

ahol: E' – a torzult hatás; c_{test} – a teszt agonista koncentrációja (a E/c görbék felvétele során használt agonista koncentrációja); E_{\max} , EC_{50} és n – a torzító agonista hiányában felvett 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 torzító agonista koncentrációjával.

A százalékos receptor okkupancia

$$\rho_{\%} = \frac{c}{c + K_A} \cdot 100\%$$

ahol: c – az agonista koncentrációja; K_A – az agonista-receptor komplex egyensúlyi disszociációs konstansa; $\rho_{\%}$ – a százalékos receptor okkupancia.

A százalékos receptor okkupancia és a százalékos hatás kapcsolata

$$E_{\%} = \left(\frac{K_A}{EC_{50}} \cdot \frac{\rho_{\%}}{100\% - \rho_{\%}} \right)^n \cdot 100\%$$

ahol: $\rho_{\%}$ – a százalékos receptor okkupancia; $E_{\%}$ – a százalékos hatás; E_{\max} , EC_{50} és n – a Hill egyenlet paraméterei; K_A – az agonista-receptor komplex ekvilibrium disszociációs konstansa.

2.10. Adatelemzés

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 méréses 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-tesztel kombinált Kruskal-Wallis tesztet 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 (az x mennyiség az illesztett egyenletben is logaritmikus formában szerepelt). Azokat a paramétereket, amelyeknek a logaritmusa követ normál eloszlást (EC_{50} , K_A , τ , c_x , A_2), úgy illesztettük, hogy az egyenletben a logaritmusukat szerepeltettük (pl. EC_{50}^n helyett $10^{n \cdot \log EC_{50}}$). 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.

3. Eredmények

3.1. Az A_1 adenzin receptor CPX iránti affinitásának változása 8 napos tiroxin-kezelés után

Az A_1 adenzin receptor affinitás adenzinnal vizsgálva

A variábilis Schild koefficiensű modell illeszkedése szignifikánsan jobb volt, mint az egységnyi Schild koefficiensű modellé mind az oldószer-, mind a tiroxin-kezelt pitvarok esetén. Ebből következően a CPX létrehozta gátlást az adenzin negatív inotróp hatásával szemben csak pA_2 értékkel (és nem pK_B -vel) tudtuk jellemezni. Az oldószer-kezelt pitvarok pA_2 értéke figyelemre méltóan nagyobb volt, mint a tiroxin-kezelt pitvaroké, miközben a 95%-os konfidencia intervallumok nem fedtek át egymással. Ugyanannyi CPX tehát erősebb gátlást hozott létre az euthyreoid pitvarokon, mint a hyperthyreoidokon.

Az A_1 adenzin receptor affinitás CPA-val vizsgálva

Szemben az adenzinnal, a CPA-val felvett E/c görbékre az egységnyi Schild koefficiensű modell szignifikánsan jobban illeszkedett mind az oldószer-, mind a tiroxin-kezelt pitvarok esetében, a CPX okozta gátlás tehát jellemezhető volt pK_B értékkel. Az oldószer-kezelt pitvarok pK_B -ja nagyobb volt, mint a tiroxin-kezelt pitvaroké, a 95%-os konfidencia intervallumok pedig nem fedtek át. Ez azt jelenti, hogy a CPX-nek kisebb az affinitása a hyperthyreoid tengerimalac pitvarok A_1 receptorához, mint az euthyreoidokéhoz, ami az eu- és hyperthyreoid tengerimalac pitvari A_1 receptorok ortosztatikus kötőhelyének eltérő szerkezetére utal.

3.2. A pitvari direkt negatív inotrópia A_1 adenzin receptor rezervje

Az A_1 adenzin receptor rezerv a NECA, CPA és CHA direkt negatív inotróp hatására nézve

Az FSCPX hatása: Az FSCPX jobbra tolta a E/c görbét, ami a kompetitív antagonizmus képét utánozza. Ez azt jelenti, hogy még a 45 perces inkubáció 10 μ M FSCPX-szel sem tudott akkora A_1 receptor frakciót inaktiválni, ami elegendő lenne a pitvari direkt negatív inotróp hatás E_{max} -ának szignifikáns csökkentéséhez.

Az operatív K_A meghatározása: Az agonisták affinitási sorrendje: NECA > CPA > CHA volt, az operatív efficacy sorrendje pedig: CPA > CHA > NECA.

A Furchgott-féle K_A meghatározása: A Furchgott-féle K_A értékek hasonlóak voltak az operatív K_A értékekhez, ennek megfelelően az affinitási sorrend: NECA > CPA > CHA. A q értékek alapján az A_1 receptorok mintegy 80-90%-a inaktiválódott az FSCPX előkezelés következtében.

A receptor rezerv jellemzése PSR értékekkel: A PSR értékek mindhárom agonista esetén lényegesen nagyobbak voltak, mint 1 (ami a minimum). Mindkét eredetű K_A -val számolva a receptor rezerv sorrendje: CPA > CHA > NECA.

A receptor rezerv jellemzése $RR_{\%}$ értékekkel: A $RR_{\%}$ alapján ugyanaz a sorrend állítható fel az agonisták receptor rezervére, mint a PSR szerint, mind az operatív, mind a Furchgott-féle K_A alapján: CPA > CHA > NECA. A $RR_{\%}$ -et a $E_{\%}$ függvényében ábrázolva azok egy maximum elérése után meredeken lefelé kanyarodva a 100%-os $E_{\%}$ -nál a 0%-os receptor rezerv értékhez tartanak.

Az A_1 adenzin receptor rezerv az adenzin direkt negatív inotróp hatására

Az FSCPX hatása: Az FSCPX előkezelés az adenzin E/c görbét is jobbra tolta a kompetitív antagonizmus képét utánozva. Ugyanakkor, míg a szintetikus

A_1 receptor agonisták E/c görbái jól szaturálódtak FSCPX jelenlétében is, az adenzin E/c görbék az FSCPX előkezelés után nem szaturálódtak teljesen.

Az operatív K_A meghatározása: Az adenzin E_m értéke megközelítette a szintetikus agonisták E_m -eit, ezzel szemben az adenzin K_A -ja két-három nagyságrenddel nagyobb volt, mint a szintetikus agonistáké.

A Furchgott-féle K_A meghatározása: Noha a q hasonló volt a szintetikus agonistákra meghatározott q -hoz, a K_A igen nagy volt, csaknem két nagyságrenddel nagyobb, mint a szintén nem kicsi operatív K_A (8-9 mM vs. 398.1 mM). Ez megkérdőjelezte az adenzin E/c görbékből meghatározott K_A értékek megbízhatóságát és értelmetlenné tette az adenzinra vonatkozó receptor rezerv meghatározást.

Az adenzinhez tartozó A_1 receptor rezerv meghatározása NBTI jelenlétében: Az adenzin transzport NBTI általi gátlása látványosan balra tolta az adenzin E/c görbét és kismértékben csökkentette az E_{max} -ot. Az FSCPX előkezelés azonban, amely önmagában jobbra tolta az adenzin E/c görbét a kontrollhoz képest, 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. Az FSCPX előkezelés tehát a látszat szerint fokozta az adenzin hatását NBTI jelenlétében. Ez a paradox eredmény a E/c görbék torzulására utal.

Az NBTI jelenlétében felvett adenzin E/c görbék korrekciója: Az NBTI jelenlétében felvett adenzin E/c görbéket NBTI jelenlétében felvett CPA E/c görbék adatainak felhasználásával korrigáltuk. A CPA direkt negatív inotróp hatását mind az FSCPX előkezelés, mind az NBTI gátolta: az FSCPX előkezelés jobbra tolta a CPA E/c görbét (növelte a $\log EC_{50}$ -et), míg az NBTI csökkentette az E_{max} -ot és a Hill koefficienszt is a $\log EC_{50}$ növelésén túl.

A P9 NBTI csoport átlagolt CPA E/c görbéjére illesztett, a P9 Kontroll csoport átlagolt CPA E/c görbéjének Hill-féle paramétereit tartalmazó RRM

egyenlet regressziós paramétere $\log(c_x) = -7.346$ volt (-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 ekvielektív.

A matematikai korrekció megváltoztatta az NBTI jelenlétében felvett adenzin E/c görbék hatás értékeinek egymáshoz való viszonyát. A korrigált hatások maximumai a következők voltak: 93.36% a P8 NBTI görbénél és 91.33% a P8 FSCPX+NBTI görbénél (az eleve korrektnek számító átlagolt P8 Kontroll görbe 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 (torzult) görbékhez képest. A korrigált P8 NBTI és P8 FSCPX+NBTI görbék szaturálódott része ugyanakkor nagyon közel került egymáshoz, ami nagy A_1 receptor rezervre utal az adenzin direkt negatív inotróp hatásra nézve tengerimalac pitvaron.

4. Megbeszélés

4.1. A tengerimalac pitvari A_1 adenzin receptor CPX iránti affinitásának változása 8 napos tiroxin-kezelés után

Eu- és a hyperthyreoid tengerimalacok pitvari A_1 receptorán határoztuk meg az ortoszerikus kötőhely affinitását CPX-szel szemben, ami jól ismert szelektív, kompetitív és ortoszerikus A_1 receptor antagonistá. Agonistaként adenzint (endogén, gyorsan metabolizálódó, nem szelektív full agonista) és CPA-t (szintetikus, relatíve stabil, szelektív full agonista) használtunk, hatásként pedig a pitvari A_1 receptorra jellemző direkt negatív inotróp választ mértük.

A CPX adenzinnal illetve CPA-val való kompetícióját tükröző E/c görbéket a Schild egyenlet globális illesztésével elemeztük. Az adenzin E/c görbékre a variábilis koefficiensű Schild modell illeszkedése volt jobb, vagyis a kapott pA_2 értékeket nem lehetett pK_B -nak tekinteni. Ezzel szemben a CPA E/c görbékre a Schild modell rögzített koefficiens ($S=1$) mellett illeszkedett jobban, tehát a pA_2 -k egyben pK_B értékek is, amelyek tisztán a CPX és az A_1 receptor kapcsolódási képességét jellemzik. Ez feltehetően az adenzin és a CPA részben eltérő kötőhely-specifitására vezethető vissza: az adenzin az intracelluláris adenilciklázhoz kötődve is csökkenti a kontrakciós erőt, míg a CPA-nak csak az A_1 receptor ortoszerikus kötőhelye iránt van számottevő affinitása.

A CPA E/c görbék pK_B értékei kisebbek voltak a hyperthyreoid pitvarokon, mint az euthyreoidokon (át nem fedő 95%-os konfidencia intervallumok mellett). Ezzel összhangban az adenzin E/c görbék pA_2 értékei is kisebbek voltak a hyperthyreoid pitvarokon. A thyreoid hormonok tehát módosítják a tengerimalac pitvari A_1 receptor ortoszerikus kötőhelyének szerkezetét, ami mérsékelten csökkenti a CPX-szel szembeni affinitást. Ezen eredményünk jelentőségét aláhúzza, hogy viszonylag kevés információval

rendelkezünk a myocardialis A_1 receptor affinitásának változásáról hyperthyreosisban (a legtöbb irodalmi K_B érték az euthyreoid állapotot tükrözi). Hyperthyreoid patkány kamrán az eddigi vizsgálatok nem találtak szignifikánsan különböző K_B értéket, hyperthyreoid patkány pitvaron azonban az A_1 receptor affinitásának kisfokú csökkenéséről számoltak be a trícíált CPX iránt. Ezt a különbséget azonban (ami kisebb volt, mint amit mi a jelen vizsgálatban találtunk) a szerzők jelentéktelennek tartották.

Ezen vizsgálatunk fő eredménye tehát az, hogy a tengerimalac pitvari A_1 receptor affinitása hyperthyreosisban mérsékelt csökkenést mutat CPX iránt az euthyreoid állapothoz képest, amelyből valamennyi ortoszterikus ligandjával szembeni affinitásának csökkenésére lehet következtetni. Ez hozzájárulhat az A_1 receptor mediálta folyamatok gyengüléséhez hyperthyreoid állapotban. Tekintettel az adenzin és a CPA direkt negatív inotróp hatásának jelentős csökkenésére a hyperthyreoid pitvarokon, feltételezhető, hogy ez a kisfokú affinitáscsökkenés csak részben felelős a jelenségért.

4.2. A direkt negatív inotróp hatás A_1 adenzin receptor rezervje tengerimalac pitvaron

A tengerimalac pitvari myocardium A_1 receptor rezervjének kvantifikálásához először meg kellett határoznunk a E/c görbét geometriailag leíró (empirikus) paramétereket és az adott agonista ekvilibrum disszociációs konstansát (K_A). Az operatív és a Furchgott-féle K_A értékek jó egyezést mutattak egymással. Meglepő volt azonban, hogy az FSCPX előkezelés nem volt képes lényegesen csökkenteni az alkalmazott négy agonista E/c görbéjének E_{max} -át, mintha az FSCPX kompetitív antagonistá lenne (noha irreverzibilis antagonistá, melyet nagy koncentrációban és hosszú ideig alkalmaztunk).

Az A₁ 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. A receptor rezerv legegyszerűbb mutatója az ún. PSR (K_A/EC_{50}). A szintetikus agonisták negatív inotróp hatásához tartozó PSR értékek sokszorososan meghaladják a minimális PSR = 1 értéket. Az operatív és a Furchgott-féle K_A alapján számolt PSR értékek alapján felállítható receptor rezerv sorrend egyaránt: CPA>CHA>NECA.

A receptor rezerv árnyaltabb jellemzője a százalékos receptor rezerv ($RR_{\%} = E_{\%} - \rho_{\%}$). A $RR_{\%}$ -et az irodalomban általában néhány konkrét $E_{\%}$ -hoz adják meg, elsősorban a félmaximális és az ún. maximális hatáshoz. A jelen munkában azonban a $RR_{\%}$ -et a $E_{\%}$ függvényében ábrázolva minden $E_{\%}$ értékhez hozzárendeltük a hozzá tartozó $RR_{\%}$ értéket. 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 A₁ receptor direkt negatív inotróp működését illetően. 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.

A fentiek alapján megállapíthatjuk, hogy tengerimalac pitvaron az általunk vizsgált három szintetikus full agonista a (közel) maximális direkt negatív inotróp hatásra nézve igen nagy A₁ receptor rezervvel bír, amely nagyobb, mint a más hatásokra meghatározott irodalmi receptor rezerv adatok.

Az A₁ receptor rezerv az adenzin pitvari direkt negatív inotróp hatására nézve

Az operatív és Furchgott-féle K_A értékek közötti több nagyságrendnyi eltérés 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. A gyors metabolikus clearance-ből fakadó nehézségek leküzdésének elfogadott módja, hogy gátolják az adenzint átalakító enzimeket és/vagy az adenzint szállító transzportereket. Ebből kiindulva ezeket a kísérleteinket megismételtük a szelektív és hatékony nukleozid transzport gátló NBTI jelenlétében, amely csökkenti az adenzin intracelluláris eliminációját.

Megdöbbenésünkre azonban az FSCPX előkezelés növelte az NBTI jelenlétében felvett adenzin E/c görbék E_{max} -át, amit a legkevésbé vártunk volna egy irreverzibilis A_1 receptor antagonistától. Ez a paradox eredmény felvetette, hogy az endogén adenzin interstitialis felhalmozódása, ami az NBTI alkalmazásának egyik következménye, ebben az esetben nem hanyagolható el.

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 adenzin 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. Más lehetőség hiányában a torzult hatásokat valamilyen matematikai modell segítségével korrigálhatjuk. Választásunk egy a munkacsoport által korábban kifejlesztett módszerre, az RRM-re esett. Ily módon az NBTI jelenlétében felhalmozódó többlet interstitialis adenzint az RRM segítségével meghatározott ekvifektív CPA koncentrációval (c_x) kvantifikáltuk, amellyel aztán korrigálni lehetett az NBTI által torzított hatás értékeket.

A korrigált hatások azt mutatják, hogy az A_1 receptorkészlet FSCPX általi depléciója valójában csökkenti az adenzin maximális direkt negatív inotróp hatását (E_{max}) NBTI jelenlétében is, ahogy az eredetileg is várható volt. Az is

kiderült azonban, hogy az E_{\max} csökkenése meglehetősen kicsi, vagyis a tengerimalac pitvari A_1 receptor rezerv az adozin kiváltotta direkt negatív inotrópiára is igen nagy. Ez összhangban van a három szintetikus A_1 receptor agonistával 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 adozin esetében.

A direkt negatív inotróp hatásra vonatkozó nagy A_1 receptor rezerv jelentősége

Mivel az elektromos aktivitás és a kamrai pumpafunkció a szív működésének legfontosabb jellemzői, az 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 trombusok (vegetatio globulosa) képződésének. A jelen vizsgálat határozta meg elsőként az A_1 receptor rezervet a pitvari kontraktilitásra nézve.

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 receptor közötti jelentős homológiából, továbbá a pitvari posztreceptorális jelátviteli utak hasonlóságából, a direkt negatív inotróp hatásra vonatkozó nagy tengerimalac A_1 receptor rezerv azt sugallja, hogy az A_1 receptor agonisták csökkenthetik a pitvari kontrakciós erőt emberben is, ami tehát az A_1 receptor agonisták lehetséges mellékhatásának látszik bármely (kardiális vagy extrakardiális) indikáció esetén.

5. Az új eredmények összefoglalása

Első vizsgálati modellünkben kiindulva **a tengerimalac pitvari A₁ receptor CPX (szelektív, ortoszterikus A₁ receptor antagonist) iránti affinitása hyperthyreosisban kismértékben csökken** az euthyreoid állapothoz képest. A kötőhely affinitáscsökkenése hozzájárulhat az A₁ 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 A₁ receptoron is tisztán kompetitív antagonist.

Második vizsgálati modellünk kísérletei során azt kaptuk, hogy az irreverzibilis A₁ receptor antagonist FSCPX (10 μM 45 percig, majd 75 perc mosás) nem csökkentette olyan mértékben a működőképes A₁ receptorok számát, ami miatt szignifikánsan csökkenne a vizsgált A₁ receptor full agonisták (NECA, CPA, CHA és adenzin) által kiváltott direkt negatív inotróp hatás maximuma tengerimalac bal pitvaron. Ezzel összhangban **a stabil, szintetikus A₁ receptor full agonisták (NECA, CPA, CHA) esetén a közel maximális direkt negatív inotróp hatáshoz tartozó A₁ receptor rezervre igen nagy, 80-92% közötti értékeket kaptunk**. Ezek a receptor rezerv értékek nagyobbak voltak minden korábbi irodalmi adatnál, ami az A₁ receptor mediálta egyéb hatásokra vonatkozott tengerimalac pitvaron. Az élő szövetben bomlékony és gyorsan kompartmentalizálódó adenzin esetében az A₁ receptor rezerv kvantifikálása nem sikerült, sőt az adenzin E/c görbék paradox módon viselkedtek NBTI (az adenzin intracelluláris eliminációját kivédő nukleozid transzport gátló) jelenlétében. Az NBTI miatt torzult adenzin E/c görbék matematikai korrekciója után azonban kiderült, hogy **az adenzin direkt negatív inotróp hatására vonatkozó A₁ receptor rezerv a szintetikus agonistákéhoz hasonlóan nagy**. Ezek az eredményeink arra utalnak, hogy a pitvari kontraktilitás igen érzékeny az A₁ receptor stimulációjára, ami miatt számítani kell a pitvari kontrakciós erő csökkenésére parciális A₁ receptor agonisták és A₁ receptor enhancer-ek esetében is, mint lehetséges mellékhatásra.

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
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
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



7. Absztraktok

Kiss Z, Pák K, Zsuga J, Ilku SM, Okos E, Varga B, Juhász B, Tósaki Á, Gesztelyi R. Az A₁ adenzin receptor rezerv változásának vizsgálata hyperthyreoid tengerimalac pitvaron. MÉT LXXVI. Vándorgyűlése, 2012., Debrecen, p. 127. (poszter)

Pák K, **Kiss Z**, Tósaki Á, Gesztelyi R. A tengerimalac pitvari A₁ adenzin receptor rezerv megbecslése az adenzin által kiváltott direkt negatív inotróp hatásra nézve. MÉT LXXVII. Vándorgyűlése, 2013., Budapest (előadás)

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki Dr. Tószaki 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.

Köszönöm Dr. Halmos Gábor egyetemi tanárnak (DEOEC GYTK Biofarmácia Tanszék), hogy kutatói pályámon elindított.

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
06 40 638 638



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