

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A receptoriális válaszkészség módszer (RRM)
sajátosságai és *in silico* alkalmazása**

Dr. Szabó Adrienn Mónika

TÉMAVEZETŐ: Dr. Gesztelyi Rudolf



DEBRECENI EGYETEM
TÁPLÁLKOZÁS- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2021.

A receptoriális válaszkészség módszer (RRM) sajátosságai és in silico alkalmazása

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

Írta: Dr. Szabó Adrienn Mónika okleveles általános orvos

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

Témavezető: Dr. Gesztelyi Rudolf

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Vecsernyés Miklós, PhD
tagok: Dr. Kozma Bence, PhD
Dr. Dér Péter, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

2021. április 9., 10 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna, akadémikus
Dr. Kardos Gábor, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Vecsernyés Miklós, PhD
tagok: Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna, akadémikus
Dr. Kardos Gábor, PhD
Dr. Kozma Bence, PhD
Dr. Dér Péter, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

2021. április 9., 11 óra 30 perc

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben részt kíván venni a vitán, jelezze azt egy a gestelyi.rudolf@pharm.unideb.hu email címre küldött üzenettel a vitát megelőző nap 16 óráig. A tárgymezőbe kérjük beírni: Szabó Adrienn részvételi szándék.

Az ember erősebb, mint a sors, s mindent ki lehet bírni, ha jó a lelkiismeretünk,

Márai Sándor

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	1
1.1. Célkitűzések.....	1
1.2. Az adenzin és az adenzin receptorok.....	1
1.3. Agonista viselkedésű adenzin analógok.....	2
1.4. Antagonista viselkedésű adenzin analógok.....	2
1.5. Inhibitor tulajdonságú adenzin analógok.....	3
1.6. Az <i>in silico</i> vizsgálat előzményei.....	3
1.7. Az <i>ex vivo</i> vizsgálat előzményei.....	5
2. Anyagok és módszerek.....	10
2.1. <i>In silico</i> módszerek.....	10
2.2. Anyagok és <i>ex vivo</i> módszerek.....	12
2.2.1. Vegyszerek és oldatok.....	12
2.2.2. Állatok és preparátumok.....	13
2.2.3. Az <i>ex vivo</i> vizsgálat csoportjai és protokolljai.....	13
2.2.4. Az <i>ex vivo</i> E/c görbék kiértékelése.....	13
2.2.5. Adatfeldolgozás.....	14
3. Eredmények.....	15
3.1. <i>In silico</i> eredmények.....	15
3.2. <i>Ex vivo</i> eredmények.....	15
4. Megbeszélés.....	17
4.1. Az <i>in silico</i> eredmények értelmezése.....	17
4.2. Az <i>ex vivo</i> eredmények értelmezése.....	18
5. Összefoglalás.....	20
6. Köszönetnyilvánítás.....	21
7. Közlemények.....	22

1. Bevezetés

1.1. Célkitűzések

PhD munkám két vizsgálatot foglal magában. Egyrészt két, eltérő támadáspontú adenzin analóg, az FSCPX (szelektív, irreverzibilis A₁ adenzin receptor antagonist: 8-cyclopentyl-3-[3-[[4-(fluorosulfonyl)benzoyl]oxy]propyl]-1-propylxanthine) és az NBTI (szelektív nukleozid transzport gátló: S-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine) interakcióját vizsgáltam korábbi *ex vivo* kísérleti adatok *in silico* reprodukciója segítségével. A másik vizsgálat során a receptorális válaszkésztség módszer (receptorial responsiveness method: RRM) optimális kivitelezési módját kerestem egy másik korábbi *ex vivo* kísérlet adatainak elemzése révén. A két terület közötti kapcsolatot egyrészt az képezi, hogy az *ex vivo* adatok ugyanazzal a metodikával készültek ugyanazon a szövettípuson (tengerimalac bal pitvari myocardium), másrészt az, hogy legfontosabb eszközünk mindkét vizsgálat során az RRM volt.

1.2. Az adenzin és az adenzin receptorok

Az adenzin adeninből és ribózból álló nukleozid, a nukleinsav anyagcsere metabolitja a guanozin, uridin, timidin és a citidin mellett. Az adenzin kitüntetett szerepe abból fakad, hogy egyben az adenzin receptorcsalád endogén agonistája is. Az adenzin nagy aktivitású enzimek szubsztrátja, ami miatt *ex vivo* és *in vivo* felezési ideje kicsi (0.6 – 10 s).

A filogenetikailag ősi purinerg receptorok közé tartozó adenzin receptorok hét transzmembrán doménnel rendelkező G protein-kapcsolt receptorok, melyek (ortosztérikus) kötőhelye az interstitium felé néz. Az adenzin receptoroknak három típusát különböztetjük meg: A₁, A₂ és A₃ adenzin receptor; az A₂-n belül pedig két altípus differenciálható: az A_{2A} és A_{2B}.

Az A₁ adenzin receptor (A₁ receptor), ami szinte minden szövetben megtalálható, köztük a myocardiumban is. Az A₁ receptor kiterjedt szabályozó funkcióval rendelkezik, amely döntően protektív és regeneratív folyamatok iniciálását foglalja magába. Ilyen protektív működésnek tekinthetők az A₁ receptor által mediált negatív tróp hatások, köztük az erőteljes negatív inotróp hatás is. Kétféle negatív inotróp

hatást különböztethetünk meg: az indirektet, ami a stimulált kontrakciós erőt redukálja a nyugalmi szintre, és a direktet, ami a nyugalmi kontrakciós erőt is képes csökkenteni. Előbbi a pitvarokon és a kamrákon is megfigyelhető, míg utóbbi csak a pitvarokra jellemző a legtöbb faj esetében.

1.3. Agonista viselkedésű adenzin analógok

A szintetikus A₁ receptor agonisták többsége az adenzinnál nagyobb féléletidejű vegyület, mivel rosszabb szubsztrátjai az adenzin metabolizmusában szereplő enzimeknek. Ezzel összhangban a nagy felezési idejű, szintetikus A₁ receptor agonisták koncentráció-hatás (E/c) görbéi balra toltak az azonos körülmények között felvett adenzin E/c görbékhöz képest. A stabil agonisták E/c görbéi emellett szabályosabbak és megbízhatóbban jellemzik az A₁ receptor működését, ezért vizsgálatainkban három szintetikus A₁ receptor agonistát is alkalmaztunk: NECA (5'-(N-ethylcarboxamido)adenosine), CPA (N⁶-cyclopentyladenosine) és CHA (N⁶-cyclohexyladenosine). Szemben az adenzin valamennyi adenzin receptor iránti affinitásával és agonista viselkedésével, a NECA csak az A₁ és A₂ receptorokat ingerli, míg a CPA és CHA szelektív A₁ receptor agonista. Noha a CHA által kiváltott maximális hatás (a negatív inotrópia tekintetében) a korábbi és a jelen vizsgálatok során valamivel kisebbnek mutatkozott, mint a többiek esetében, mind a négy fentebb említett ligandot az A₁ receptor full agonistájaként tartják számon.

A NECA, CPA és CHA esetében megfigyelték, hogy az általuk aktivált A₁ receptor eltérő preferenciával kapcsolódik különböző típusú G proteinekhez, bár az A₁ receptor esetében a különböző agonisták funkcionális szelektivitása általában nem eredményez különösebben diverz hatásokat. A funkcionális szelektivitás („torzult agonizmus”) létezése minden esetre aláhúzza a többféle agonista használatának előnyös voltát ugyanabban a biológiai rendszerben valamely hatás vagy jelenség vizsgálatakor.

1.4. Antagonista viselkedésű adenzin analógok

A CPX avagy DPCPX (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine) és az FSCPX (8-cyclopentyl-3-[3-[[4-(fluorosulfonyl)benzoyl]oxy]propyl]-1-propylxanthine) olyan adenzin analógok, amelyek szelektív A₁ receptor antagonisták. A CPX kötődése az A₁

receptorhoz reverzibilis és így azt kompetitív módon gátolja. Az FSCPX először szintén reverzibilisen kötődik az A₁ receptorhoz, ezt azonban egy időigényes, feltehetően kovalens kapcsolódási lépés követi, amely az FSCPX-et irreverzibilis antagonistává teszi. Az FSCPX kedvezőtlen tulajdonsága, hogy vizes közegben gyorsan (pár perc alatt) elbomlik. Érdekes módon ennek ellenére *ex vivo* illetve *in vivo* ki tudja fejteni irreverzibilis gátló hatását. Ez felveti, hogy élő biológiai rendszerekben azok lipid fázisába oldódva az FSCPX védetté válik és el tudja érni membránhoz kötött célpontját, az A₁ receptort.

1.5. Inhibitor tulajdonságú adenosin analógok

Fiziológias viszonyok között a szívizom adenosin metabolizmusát nettó interstitialis keletkezés és intracelluláris elimináció jellemzi, ezért a cardiomyocyták nukleozid transzporterein az adenosin folyamatosan a sejtek belseje felé áramlik. Ez a transzmembrán adenosin áramlás elsősorban nagy kapacitású, ENT1 típusú transzportereken keresztül folyik, melyek ekvibratívok és nitrobenziltioinosinnal gátolhatóak. Nitrobenziltioinosin típusú vegyület az S-(4-nitrobenzyl)-6-thioinosine és az S-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine. Vizsgálataink során ez utóbbit használtuk (és NBTI-nek rövidítettük). Az NBTI általi ENT1 blokádnál az általunk használt *ex vivo* tengerimalac bal pitvar modellen is növeli az endogén adenosin interstitialis koncentrációját, melyet a cardiomyocytákba irányuló adenosin transzport gátlása és ezáltal az (extracellulárisnál jóval intenzívebb) intracelluláris adenosin elimináció kivédése magyaráz. Az NBTI endogén adenosinra kifejtett hatásának vizsgálatára munkacsoportunk a korábbiakban saját módszert fejlesztett ki (receptorális válaszkésztség módszer: receptorial responsiveness method, röviden RRM). Ennek során NBTI jelenlétében olyan A₁ receptor agonistával veszünk fel E/c görbét, aminek az interstitialis koncentrációját nem befolyásolja az NBTI.

1.6. Az *in silico* vizsgálat előzményei

Izolált, ingerelt tengerimalac bal pitvaron (ami a myocardialis adenosinerg rendszer tanulmányozásának egyszerű és megbízható modellje) munkacsoportunk korábbi vizsgálataiban paradox jelenséget tapasztalt az FSCPX-szel kapcsolatban,

melyet a szakmai közmegegyezés szelektív, irreverzibilis A₁ receptor antagonistának tart. Nevezetesen azt, hogy NBTI jelenlétében az FSCPX előkezelés növelte az adenzin által kiváltott maximális választ (növelve az adenzin E/c görbék E_{max} értékét). Munkacsoportunk tagjai egy későbbi vizsgálatukban *in silico* rekonstruálták az érintett E/c görbékét. A különböző adenzin analógok szimulált viselkedése alapján feltételezték, hogy az FSCPX előkezelés megváltoztatja az NBTI hatását a E/c görbékre. Ennek mechanizmusaként felvetették, hogy az FSCPX úgy módosítaná az ENT1 nukleozid transzportert, hogy az megőrzi adenzin-áteresztő képességét, de az NBTI kevésbé fogja tudni gátolni.

Ezt követően a munkacsoporttal az FSCPX-nek ezt a feltételezett hatását vizsgáltuk meg izolált, ingerelt tengerimalac bal pitvaron. Ennek eredményei alapján alkottunk meg azt a hipotézist, mely szerint az FSCPX előkezelés az NBTI-nek az adenzin receptor agonisták E/c görbéjére kifejtett két hatása közül csak azt gátolja, amit az endogén adenzin interstitialis koncentrációjának (NBTI okozta) növekedése mediál. Az NBTI másik hatását az exogén adenzin interstitialis koncentrációjának emelkedése közvetíti (amennyiben kerül a rendszerbe exogén adenzin), amit új hipotézisünk szerint az FSCPX előkezelés változatlanul hagy. Mindezek háttérében, mint hatásmechanizmus, az állhat, hogy az FSCPX gátolja a szív interstitialis adenzin termelésében résztvevő valamelyik enzimet. Az FSCPX ezen tulajdonságát rajtunk kívül még senki sem vetette fel.

Az adenzin endogén ill. exogén eredete ebben a munkacsoport által használt kísérleti elrendezésben igen lényeges szempont, mivel az endogén ill. az exogén adenzin interstitialis szintjének emelkedése éppen ellentétes hatást fejt ki az adenzin E/c görbéjére. Általánosságban az NBTI – a fiziológias viszonyok között a cardiomyocyták belseje felé irányuló adenzin transzport gátlásával és ezáltal az adenzin intracelluláris eliminációjának kivédésével – növeli az interstitialis adenzin koncentrációt, természetesen az adenzin eredetére való tekintet nélkül. A rendszerünkben jelentkező különbség oka, hogy NBTI jelenlétében az endogén adenzin még a E/c görbe felvétele előtt akkumulálódik az interstitiumban, míg az exogén adenzin szükségszerűen csak a E/c felvételekor jut a rendszerbe. Ebből következően a többlet endogén adenzin nem jelenik meg a E/c görbe X adataiban és az általa kifejtett receptorialis hatás is oly módon tükröződik a későbbi E/c görbe Y adataiban, hogy gyengül a E/c görbe felvételéhez használt agonista hatása (mivel kisebb

a E/c görbe számára rendelkezésre álló receptoriális válaszadási kapacitás). Ennek következtében a többlet endogén adenzin jelenlétében felvett (adenozinerg) E/c görbe a kontroll körülmények között készített képest csökkent válaszkészséget mutat (kisebb E_{max} és nagyobb EC_{50}). Ezzel szemben, ha a E/c görbe adenzinnal kerül felvételre, az NBTI kivédi az exogén adenzin intracelluláris bontását, ezért az adenzin E/c görbe a kontroll görbéhez képest fokozott válaszkészséget sugall (valamivel nagyobb E_{max} és kisebb EC_{50} értékkel). Fontos leszögezni, hogy mindeközben a preparátumok tényleges A_1 adenzinerg válaszkészsége ugyanakkora (a kontroll értékkel megegyező), tehát az endogén ill. az exogén adenzin többlet valójában csak a hagyományos módon felvett és ábrázolt E/c görbét torzítja (úgy, mintha az A_1 receptor válasz csökkenne ill. nőne).

PhD munkám során az első céлом az FSCPX és az NBTI hatásai közötti interakció további részleteinek felderítése, valamint ezek fényében a korábbi idevágó *ex vivo* és *in silico* vizsgálatok következtetéseinek újragondolása volt. Ehhez egy korábbi (2018-as) munkánk nyolc E/c görbét vettük alapul, melyeket az új vizsgálatban *in silico* rekonstruáltunk. A E/c görbe szimuláció során különböző előfeltevések alapján különböző modelleket hoztunk létre, majd ezeket összehasonlítottuk az eredeti (*ex vivo*) E/c görbékkel. Mivel a receptoriális válaszkészség módszer (RRM) figyelembe tudja venni az endogén ill. az exogén adenzin hatásai közötti különbséget (vizsgálataink fentebb részletezett körülményei között), ezt a módszert is felhasználtuk az FSCPX-NBTI paradoxon feltárását célzó új munkánk során.

1.7. Az *ex vivo* vizsgálat előzményei

Az RRM elméleti háttérét a receptorelmélet, a farmakológia legjellegzetesebb szellemi vívmánya képezi. A receptorelmélet nagy előnye, hogy számos, kvantitatív vizsgálatra alkalmas módszert alapoz meg teoretikusan. Receptorok, ligandok, sejt-, szövet- illetve teljes test-szintű működések állandóit (és néha változó paramétereit) többféle megközelítéssel is meg lehet határozni. Ennek egyik lehetősége olyan, a kérdéses állandókat illetve paramétereiket tartalmazó egzakt modellek (egyenletek) kifejlesztése, amelyeket megfelelően előkészített, biológiai mérésekből származó adatokra lehet illeszteni és ezzel előbbiek értékét megbecsülni. Az első kvantitatív receptor modellnek a Hill egyenlet tekinthető, ami eredetileg az egyszerű ligandkötés

kinetikájának leírására szolgált. A kiváltott hatást a koncentrációhoz három állandó segítségével kapcsoló Hill egyenlet az alapja a receptorműködés minden továbbfejlesztett kvantitatív (vagy szemikvantitatív) modelljének, mint például a széles körben használt operatív modellnek és a legújabb SABRE (Signal Amplification, Binding affinity and Receptor activation Efficacy) modellnek. Más modellek célja speciális problémák megoldásában való segítség. Ilyen az RRM is, ami a Hill egyenletet egy olyan összefüggéssel kombinálja, amely egy (vagy két) agonista két koncentrációja és az általuk kiváltott szimultán hatások közötti kapcsolatot írja le, amennyiben az egyik koncentráció ismert, a másik viszont nem (c_x). Az RRM ennek a c_x -nek a meghatározására alkalmas a receptorai mikro környezetében (bizonyos körülmények között, pl. ha a c_x mint akut koncentráció-növekedés jelentkezik a rendszerben). Fontos, hogy az RRM modelljét megbízható adatokra illesszük, az illesztés pedig technikailag megfelelően legyen kivitelezve.

Az RRM egy egyszerű nemlineáris regresszió alapuló eljárás, melynek modellje két változót (X , Y) és (legalább) egy meghatározandó paramétert (c_x) tartalmaz. A modell illesztése két garnitúra E/c görbe felvételét igényli. Az RRM számára megfelelő E/c görbék olyan XY gráfok, ahol X az agonista koncentráció (logaritmusa), Y pedig a biológiai rendszer válasza, melyet a hozzá tartozó X koncentráció váltott ki egyedül (első garnitúrás E/c görbe) vagy egy egyszeri (állandó nagyságú) többlet koncentrációval közösen, ami ugyanahhoz vagy egy másik agonistához tartozik és ami közvetlenül a E/c görbe felvétele előtt került a rendszerbe (második garnitúrás E/c görbe). Az RRM kivitelezése ennek az egyszeri többlet koncentrációnak a (c_x -ként való) meghatározását célozza.

Noha a második garnitúrás E/c görbe a két koncentráció eredő hatását kizárólag a E/c görbe felvételéhez használt agonista koncentrációhoz rendeli (az X értékhez), az RRM modellje az eredő hatást két koncentrációval kapcsolja össze, még hozzá a E/c görbe felvételéhez használt agonista két koncentrációjával. Az egyik ezek közül az aktuális X érték, a másik pedig a E/c görbe felvételéhez használt agonista azon koncentrációja (c_x), ami ekvieffektív a meghatározandó egyszeri, többlet agonista koncentrációval. Ha a két koncentrációhoz tartozó agonisták azonosak, a c_x valós koncentráció, ha nem, a c_x a másik agonista egyszeri, többlet koncentrációjának helyettesítő paramétere. Az RRM alkalmazására akkor a leghasznosabb, ha a kérdéses többlet agonista koncentráció ismeretlen és más módon való meghatározása nehézségbe

ütközik. Mivel a többlet agonista koncentráció torzítja a második garnitúrás E/c görbét a neki megfelelő első garnitúráshoz képest (amit mindenben hasonló körülmények között vettek fel, kivéve a többlet agonista koncentrációt), a továbbiakban torzító koncentrációként hivatkozunk rá.

Az RRM tehát egy adott receptorpopuláció mikrokörnyezetében levő valamely agonista koncentrációjában beállt akut növekedés kimutatására és – bizonyos korlátok között – meghatározására alkalmas. Fontos leszögezni, hogy a receptorok mikrokörnyezete más módszerekkel nehezen vizsgálható szöveti kompartment, különösen mozgó szervekben, illetve bomlékony agonisták esetén. Elméletileg az RRM minden receptor esetében alkalmazható, az A_1 receptor azonban különösen alkalmas erre a vizsgálatra, köszönhetően lassú és inkomplett deszenzitizációjának akár full agonista tartós jelenléte mellett is.

A regresszióanalízis (különösen a nemlineáris) az egyik legelterjedtebb módja a E/c görbék elemzésének, melynek segítségével sok olyan értékes információ szerezhető a receptorok, a ligandok és az általuk befolyásolt sejtfunkciók tulajdonságairól, melyeket más módon nehezen lehetne megszerezni. A regresszió (görbeillesztés) célja meghatározni a modell paramétereinek legmegfelelőbb értékeit és ezáltal megszerkeszteni a legjobban illeszkedő regressziós függvényt (görbét), amelyik a legközelebb fut az adatpontokhoz (a tipikusan ismételt mérések révén beszerzett XY adatokhoz). A regressziós paraméterek optimális értékeit a legrégebben és máig a leggyakrabban az ún. legkisebb négyzetek elve alapján határozzák meg. Ennek lényege, hogy minimalizálják az adatpontok görbétől mért távolsága függőleges komponensei négyzeteinek összegét. A módszer – gyakorlati szempontból – két legfontosabb feltételezése:

1. normalitás, vagyis az azonos X értékhez tartozó adatpontok (Y replikátumok) szórása a regressziós görbe ugyanazon X-hez tartozó Y értéke körül Gauss-féle eloszlást követ;

2. homoszkedaszticitás, vagyis az előbbi szórás mértéke azonos az összes X-re nézve.

Ad 1. Gauss eloszlás feltételezése és ennek megfelelően hagyományos regresszió (ordinary regression) kivitelezése a legtöbb, biológiai mintán végzett vizsgálatból származó adathalmaz esetében célravezető választás. Mindazonáltal Lorentz eloszlás

feltételezése és ezért robusztus regresszió (robust regression) alkalmazása a görbeillesztést érzéketlenebbé teszi a kiugró értékek torzító hatásával szemben, igaz, emiatt elvész a meghatározás megbízhatóságát jellemző számítások elvégzésének lehetősége, így a regressziós paraméterekre kapott értékekhez nem kapunk standard hibát, konfidencia intervallumot, illetve konfidencia vagy predikciós sávokat (confidence or prediction bands). Bizonyos esetekben megfontolás tárgya lehet Poisson eloszlás feltételezése és ebből kiindulva Poisson regresszió kivitelezése. Mivel Poisson regresszió nem végezhető normalizált Y adatokon, a mi vizsgálataink során nem merült fel az alkalmazása. A Gauss illetve a Lorentz eloszlás egyaránt lehetővé teszi a legkisebb négyzetek elvének alkalmazását, amit megmagyaráz, hogy mindkettő t eloszlás, még hozzá annak két szélső esete (végtelen illetve 1 szabadsági fok mellett, a felsorolás sorrendjében). Ezzel szemben a Poisson eloszlást feltételező Poisson regresszió speciális elméleti megközelítést igényel (maximum likelihood-based parameter estimation).

Ad 2. A heteroszkedaszticitás okozta torzítás ellensúlyozására a legkisebb négyzetek elvén alapuló módszer standard egyenlete különböző tényezőkkel módosítható, melyet súlyozásnak hívnak. A leggyakoribb ilyen tényező az $1/Y^2$ (relatív súlyozás) és az $1/|Y|$ (Poisson súlyozás). A relatív súlyozás és – kisebb mértékben – a Poisson súlyozás csökkentik a nagyobb Y értékek befolyását a regressziós paraméterek értékére és a regressziós görbére. Emellett a Poisson súlyozás (hagyományos regresszióval kombinálva) a Poisson regresszió kényszer szülte alternatívájaként is szolgálhat. További lehetőség az elméleti megfontolások alapján ígéretesnek tűnő, de a gyakorlatban ritkán használt súlyozás $1/SD^2$ -tel (vagyis az ugyanazon X értékekhez tartozó Y értékek varianciájának reciprokával), ami a többiekénél nagyobb szórású Y replikátumok indokolatlanul nagy súlyának csökkentését célozza.

Görbét (azaz egy egyenletet) általában individuálisan illesztnek, vagyis a regressziós paraméterek értékeit egyetlen adathalmazra határozzák meg. Ez lehet egyetlen E/c görbe, de a mai technikai és szoftveres lehetőségek mellett lehet E/c görbék egy csoportja, amelyben a görbék ismételt mérésekből származnak (azaz ugyanazt az információt hordozzák – természetesen random hibával terhelt). A görbeillesztés fejlettebb módja a globális illesztés, amikor is a regressziós modell (tehát az illesztett egyenlet) egy görbecsaládot határoz meg, vagyis olyan függvényeket, amelyeknek néhány (minimum 1) paramétere közös (tehát ugyanazt az értéket veszi fel minden görbe

esetében). Globális regresszió során egyszerre több adathalmazra történik a görbecsalád illesztése, és a művelet precizitását (precision) egyetlen négyzetösszeg jellemzi.

PhD munkám során a második célom az volt, hogy feltárjam a különböző görbeillesztési módok (individuális vagy globális) és görbeillesztési beállítások (melyek az Y értékekre különböző eloszlásokat illetve szórási mintázatokat feltételeznek) hatását az RRM által szolgáltatott eredményekre. Az ennek felderítését célzó kísérletek során minden mintán két E/c görbét vettünk fel. Az elsőt adenzinnal, melynek szerepe a felhasznált tengerimalac bal pitvarok A₁ receptor stimulációra adott natív válaszainak felmérése volt. Az adenzin különösen alkalmas erre a célra, mivel gyorsan és zavaró metabolitok keletkezése nélkül eliminálódik a rendszerből. A második E/c görbéhez három, széles körben használt, az adenzinnál stabilabb, szintetikus A₁ receptor agonista (CPA, NECA, CHA) egyikét használtuk, még hozzá ugyanazon agonista egyetlen torzító koncentrációjának hiányában illetve jelenlétében. Az RRM pontosságát (accuracy) és precizitását (precision) az ismert nagyságú torzító koncentráció meghatározásával vizsgáltuk jól bevált izolált, ingerelt tengerimalac bal pitvar modellünkön. A torzító koncentrációhoz és a E/c görbe felvételéhez használt agonista azonosságából következően az RRM által szolgáltatott c_x becslés közvetlenül a torzító koncentrációt adta meg.

Ezen vizsgálatunk során is az A₁ receptor agonisták által kiváltott negatív inotrópiát határoztuk meg, mint hatást. A kamrai myocardium nyugalmi kontrakciós erejét a legtöbb emlősben nem csökkenti az A₁ receptor, csak az emelkedett intracelluláris cAMP-szint miatti fokozott kontraktilitást viszi vissza a nyugalmi szintre. Az emlős pitvari myocardiumban ugyanakkor az A₁ receptor aktiváció a nyugalmi kontrakciós erőt is képes csökkenteni (még hozzá jelentős mértékben), amit direkt negatív inotróp hatásnak nevezünk. Mivel *ex vivo* kísérleteink során ingerelt bal pitvart használtunk, az A₁ receptor-mediálta negatív tróp-hatások egyedül mint a nyugalmi kontrakciós erő csökkenése juthattak érvényre. Ennek fontos szerepe van kísérleti adataink megbízhatóságát és jó interpretálhatóságát illetően, mivel a direkt negatív inotrópia egyébként érzékeny az összehúzódások frekvenciájában beálló változásokra.

2. Anyagok és módszerek

2.1. *In silico* módszerek

Az A_1 receptor agonisták hatását az izolált, ingerelt tengerimalac bal pitvar kontrakciós erejére *in silico* E/c görbékkel modelleztük. A szimulált E/c görbék előállításához az agonizmus operatív modelljét alkalmaztuk, ami képes kezelni egy agonista hatását és két agonista egyidejű hatását is. Az operatív modell általános és kvantitatív módon írja le a kapcsolatot egy (vagy két) agonista koncentrációi és az általuk kiváltott receptorális válaszok között. A modell tartalmazza mindazon paramétereket, amelyek szükségesek az FSCPX és az NBTI hatásának figyelembevételéhez, ilyenek a működőképes receptorok koncentrációja és a két különböző agonista egyidejű jelenléte.

Az exogén és endogén eredetű adenzin eltérő hatásait a munkacsoport saját fejlesztésű eljárásával modelleztük, ami az RRM alkalmazásán alapul. Ezen eljárással két, egyidőben jelen lévő agonista (ugyanazon a receptor populáción kifejtett) együttes hatását szimuláltuk abban a speciális esetben, amikor a magát egyetlen koncentrációval képviseltető egyik agonistát és annak hatását figyelmen kívül hagytuk (és ezáltal torzult hatásokat detektáltunk). A figyelembe nem vett agonista koncentráció modellezte az NBTI által felhalmozott endogén adenzin okozta interstitialis adenzin koncentráció többletet, ami már az (exogén) adenzinnal illetve CPA-val való E/c görbe felvétel előtt kialakult a rendszerben.

A kiindulási adatok és feltételezések változtatásával négy modellt és a 4. modellhez két kiegészítő variánst határoztunk meg, melyek segítségével hat E/c görbe készletet szerkesztettünk. Mindegyik görbe készlet nyolc E/c görbét tartalmazott, melyek közül négy egy bizonyos „A” agonistához köthető, négy pedig egy „C” agonistához. A szimulált E/c görbék jellemzését és megjelenítését a Hill egyenlet egy alkalmas formájának illesztésével biztosítottuk.

Az A_1 receptor endogén agonistájának, az adenzinnak a szervkádban működtetett tengerimalac bal pitvarszövetben mutatott sajátosságait a szimuláció „A” agonistájával vettük figyelembe. Lokalizáció alapján két A agonista koncentrációt különböztettünk meg, egy „szervkádbeli” és egy „receptorközeli” koncentrációt. Eredet

szempontjából kétféle A agonistát modelleztünk, „exogén” (a E/c görbe felvétele során beadott) és „endogén” (a pitvari myocardiumban keletkező) A agonistát.

Az adenzin sejtbe irányuló transzportját eltérően modelláltuk az exogén és az endogén A agonista esetében. Transzport inhibitor hiányában a „szervkádbeli” A agonista koncentrációt 400-zal elosztottuk, mielőtt a hozzá tartozó hatást kiszámoltuk volna. (Ez megfogalmazható úgy is, hogy a hatást mindig a „receptorközeli” koncentrációból számoltuk, ami A agonista esetében, ha nem volt jelen transzport gátló, a „szervkádbeli” koncentráció 1/400-ad része volt.) Ez az eljárás azt szimulálta, hogy *in vivo* illetve *ex vivo* egy, a sejtek által gyorsan inkorporált agonista koncentrációja a sejt felszíni receptorai közelében kisebb, mint a vérplazmában vagy a szervkád folyadékában. Transzport inhibitor jelenlétében ugyanakkor a „szervkádbeli” A agonista koncentrációt nem osztottuk el a hatás kiszámolása előtt, vagy ha mégis, akkor egy 400-nál sokkal kisebb számmal (6-tal vagy 6·14.8952-vel). Ezzel szemben az endogén adenzin többlet interstitialis koncentrációját (ami transzport gátló jelenlétében halmozódik fel) mint az A agonista egy c_{bias} koncentrációját vettük figyelembe, melynek értékét vagy önkényesen állapítottuk meg, vagy a legutóbbi *ex vivo* vizsgálatunk adatait használtuk fel. Minden c_{bias} beszámításával megszerkesztett E/c görbe (vagyis minden, transzport gátló jelenlétét szimuláló E/c görbe) „torzult” minősítést kapott. Ezzel azt szimuláltuk, hogy a c_{bias} és az általa kiváltott hatás figyelmen kívül lett hagyva a nyers E/c görbe adatok feldolgozásakor. (Valóban ez a helyzet olyan E/c görbe adatok hagyományos kiértékelésekor, ahol pl. egy transzport gátló hatására felszaporodik egy olyan endogén agonista a rendszerben, ami befolyásolja a mért hatást.)

A szintetikus A_1 receptor agonista CPA tulajdonságait az izolált, ingerelt tengerimalac bal pitvaron a szimuláció C agonistájával modelleztük. A CPA enzimekkel szembeni fokozott rezisztenciáját megjelenítendő a C agonista „szervkádbeli” és „receptorközeli” koncentrációját egyenlőnek vettük. Ennek megfelelően a C agonista „szervkádbeli” koncentrációját sosem osztottuk el, amikor az általa kiváltott hatást számoltuk ki.

Az irreverzibilis A_1 receptor antagonistá FSCPX-et a szimuláció során az X vegyület reprezentálta. Az X vegyülettel végzett előkezelés hatását a teljes receptor koncentráció 5.556-tal való elosztásával vettük figyelembe, ami az A_1 receptorok 18%-ának éppen maradását szimulálta, összhangban a munkacsoport korábbi eredményeivel. A 4. modell (és variánsai) esetében, amennyiben transzport gátló volt jelen, az X

vegyülettel való előkezelést egy további művelettel is figyelembe vettük, és pedig a c_{bias} értékének megváltoztatásával. Ezen túl a 4. modell 2. variánsában, ha transzport inhibitor volt jelen, az X vegyülettel végzett előkezelést egy harmadik művelettel is figyelembe vettük, még hozzá egy 14.8952-vel való osztással az exogén A agonista „receptorközeli” koncentrációjának kiszámolásakor.

A nukleozid transzportot (pontosabban annak ENT1 típusát) gátló NBTI szimulációinkban mint NB vegyület jelent meg. Ennek jelenlétét egyrészt az exogén A agonista „szervkádbeli” koncentrációjának elosztásával vettük figyelembe (ld. fentebb), másrészt egy c_{bias} paraméter bevezetésével, ami az endogén A agonista interstitialis (ily módon „receptorközeli”) koncentráció-növekménye. A kezdeti modellek (1-3.) csak egyféle c_{bias} -t tartalmazhattak, míg a végső (4.) modellben és két variánsában a c_{bias} két értéket is felvehetett: egyet a csak NB vegyülettel való kezeléskor, egy másikat pedig az X+NB kezelés esetén. Az 1. és 2. modellben a c_{bias} értéke önkényes volt, a 3. és 4. modellben viszont a legutóbbi *ex vivo* vizsgálatunk során meghatározott többlet interstitialis adenzin koncentrációk. Mint már fentebb is utalás történt rá, a 4. modellben és variánsaiban interakciót feltételeztünk az X vegyülettel való előkezelés és az NB vegyülettel való kezelés között.

Az eredmények bemutatásakor a szimulált E/c görbék hatás értékeit mindig az adott exogén agonista „szervkádbeli” koncentrációinak függvényében ábrázoltuk. Ez összhangban áll azzal a ténnyel, hogy *ex vivo* adatokat megjelenítő E/c görbék esetén is rendszerint ezek a koncentráció értékek ismertek.

2.2. Anyagok és *ex vivo* módszerek

2.2.1. Vegyszerek és oldatok

A preparátumok közegeként, az adenzin feloldásához és a többi vegyület törzsoldatának hígításához Krebs-Henseleit puffert (Krebs-oldat) használtunk. A használt vegyszerek: adenzin, CPA (N⁶-cyclopentyladenosine), NECA (5'-(N-ethylcarboxamido)adenosine) és CHA (N⁶-cyclohexyladenosine) (Sigma, St. Louis, MO, USA). Az adenzint 36°C-os Krebs-oldatban, CPA-t, NECA-t és CHA-t 1:4 etanol:víz (v/v) elegyben oldottuk fel (az etanol koncentrációja nem haladta meg a 0.23%-ot (v/v) a szervkádban).

2.2.2. Állatok és preparátumok

A kísérletekhez 600-800 g testtömegű, hím, Hartley típusú tengerimalacokat használtunk fel. Az állatok tartása és feldolgozása összhangban volt a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottságának Etikai Kódexével és a vonatkozó Európai Unió előírásokkal (25/2013/DEMÁB).

A tengerimalacokat guillotine segítségével dekapitáltuk és izoláltuk a bal pitvarok fülcséit. A pitvarfülcséket 10 ml-es, Krebs-oldatot tartalmazó, vertikális állású szervkádakban függesztettük fel 10 mN nyugalmi feszülés mellett. A Krebs-oldatot folyamatosan karbogénnel (95% O₂ és 5% CO₂) szellőztettük (pH=7,4; 36 °C). A pitvarokat platinaelektroddal pontszerűen ingereltük a küszöbfeszültség kb. másfél-kétszeresével (kb. 1 V, 3 Hz, 1 ms impulzusszélesség). A kontrakciós erőt az izometriás összehúzódások amplitúdója jellemezte, amit transzducerrel mértünk.

2.2.3. Az *ex vivo* vizsgálat csoportjai és protokolljai

A szervkádakban felfüggesztett, működő pitvarokat random hat csoportba osztottuk: Intakt CPA csoport, Torzult CPA csoport, Intakt NECA csoport, Torzult NECA csoport, Intakt CHA csoport, Torzult CHA csoport (n = 5-7). A pitvarokat először 40 percen át inkubáltuk Krebs-oldatban, amit először 5, majd 10 percenként cseréltünk rajtuk („mosás”). Ezután kumulatív E/c görbét vettünk fel rajtuk adenzinnel, amit 15 perc mosás követett. Ezt követően az Intakt jelzésű csoportokban kumulatív CPA, NECA vagy CHA E/c görbét vettünk fel annak megfelelően, hogy milyen agonista szerepelt a csoport nevében, amelybe az adott preparátum tartozott. Eközben a Torzult jelzésű csoportokban levő pitvarokhoz egyetlen dózisban CPA-t (100 nM), NECA-t (100 nM) vagy CHA-t (300 nM) mértünk (a csoport nevével összhangban), mint torzító koncentrációt (c_{bias}). Miután ennek hatása kialakult, ugyanazzal az agonistával kumulatív E/c görbét vettünk fel a pitvarokon.

2.2.4. Az *ex vivo* E/c görbék kiértékelése

A E/c görbe felvétele során beadott minden agonista koncentrációhoz megkerestük a jelenlétében kialakult legkisebb kontrakciós erőt és ezt használtuk fel a

hatás kiszámolásához. A hatást úgy definiáltuk, mint a pitvarok kiindulási kontrakciós erejének százalékos csökkenését.

Az egyedi illetve csoportonként átlagolt E/c görbe adatokra először a Hill modellt illesztettük (az átlagolást a statisztikai számításokra és ábrakészítésre használt szoftver végezte).

A csoportonként átlagolt CPA, NECA és CHA E/c görbékre az RRM modelljét is illesztettük. Az illesztés két különböző módon, individuálisan és globálisan történt, emellett a következő illesztési beállításokat használtuk: hagyományos illetve robusztus regresszió, továbbá a súlyozás hiánya, súlyozás $1/Y^2$ -tel illetve súlyozás $1/SD^2$ -tel. A különböző regressziós módokat (individuális illetve globális) és illesztési beállításokat minden, a kivitelező szoftver által megengedett formában kombináltuk. Az azonos csoportban a E/c görbe azonos koncentrációjához tartozó Y értékeket egyedi pontoknak („individual points”) tekintettük, ahogy a szoftver leírása ajánlotta, kivéve az $1/SD^2$ -tel való súlyozást, ahol az Y replikátumok átlaga volt az egyetlen opció. Minden más beállítás esetében az alapértelmezett opciót alkalmaztuk.

A regresszió eredményeit két indikátorral jellemeztük: egyrészt a $\log c_x$ regressziós paraméter numerusának (c_x) távolságával a megfelelő c_{bias} -tól (accuracy of the best-fit value), másrészt, ahol lehetőség nyílt rá, a $\log c_x$ 95%-os konfidencia intervallumának szélességével (precision of the curve fitting).

2.2.5. Adatfeldolgozás

Az adatok eloszlásának normális voltát Shapiro-Wilk teszttel ellenőriztük. Kettőnél több adatsortot egyszempontú ANOVA-val és az azt követő Tukey poszt-teszttel hasonlítottunk össze.

A görbeillesztéshez használt egyenletekben a koncentrációkat (c , EC_{50} , c_x) 10-es alapú logaritmusként fejeztük ki. A statisztikai elemzés, a görbeillesztés és az ábrák készítése az *in silico* vizsgálatban 8.1.1 verziójú, az *ex vivo* vizsgálat során pedig 8.2.1 verziójú GraphPad Prism szoftverrel történt (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Egyéb számításokhoz Microsoft Excel 2016 szoftvert használtunk (Microsoft Co., Redmond, WA, USA).

3. Eredmények

3.1. *In silico* eredmények

A korábbi *ex vivo* kísérletek során kapott nyolc E/c görbe *in silico* rekonstrukciója a 4. modell alapformája esetén bizonyult a legjobbnak, vagyis abban a modellben, amelynek a következő tulajdonságai és azt megalapozó feltételezései voltak:

1. Az endogén és exogén A agonistát (*in silico* adenzin) teljesen külön kezeltük, vagyis a E/c görbékre kifejtett eltérő hatásuk mellett feltételeztük, hogy az X vegyület (*in silico* FSCPX) is másképp befolyásolja az NB vegyület (*in silico* NBTI) rájuk kifejtett hatását. Ez a különbség abban nyilvánult meg, hogy az X vegyület az NB vegyületnek csak az endogén A agonista interstitialis koncentrációjára kifejtett hatását gátolta a modellben.

2. Az agonizmus operatív modelljének E_m paramétere (a receptor lehetséges maximális funkciója) 90%-ra lett beállítva, vagyis kisebb értékre, mint a mi rendszerünkre jellemző elvi maximum (100%). Ehhez az eredményünkhöz (a maximálisnál kisebb E_m előnyös volta) nehéz konkrét mechanizmus(oka)t társítani. Talán azzal függhet össze, hogy ez az elvi maximum olyan „valóságidegen” állapot, mint az elérhetetlen a 0 K hőmérséklet vagy a tökéletes vákuum (abszolút 0 nyomás).

3. Az NB vegyület csak lassította az A agonista transzportját (vagyis nem gátolta meg teljesen).

4. Az NB vegyület hatását két c_{bias} értékkel vettük figyelembe. Ez a két c_{bias} a legutóbbi *ex vivo* vizsgálatunk (melynek nyolc E/c görbét szimuláltuk) során meghatározott két c_x érték volt (az NB kezeléshez a csak NBTI jelenlétében mért c_x -et, az X+NB kezeléshez pedig az FSCPX előkezelést követő NBTI kezelés során mértet rendeltük). Ezzel a 4. modell alapformájában interakciót feltételeztünk az X és az NB vegyület hatásai között.

3.2. *Ex vivo* eredmények

A c_x értékek minden olyan esetben elfogadható becslést adtak a torzító koncentrációra (c_{bias}), amikor az RRM-et súlyozás nélkül kiviteleztük. Ezzel szemben az $1/SD^2$ -tel, de különösen az $1/Y^2$ -tel végzett súlyozás drámaian rontotta a becslés

pontosságát, sőt néhány esetben egyenesen lehetetlenné tette a görbeillesztést. A súlyozás nélküli individuális illesztés hagyományos regresszió esetén szűk 95%-os konfidencia intervallumokat eredményezett. Ugyanez globális regresszió mellett azonban tág 95%-os konfidencia intervallumokhoz vezetett.

Várakozásainkkal ellentétben a globális regresszió nem javította az RRM alkalmazhatóságát. A globális illesztés, noha gyorsabb és kényelmesebb volt, pontatlanabb becslést eredményezett, mint a klasszikus individuális illesztés. Ezzel összhangban a globális regresszió inkább növelte, mintsem csökkentette volna a görbeillesztés bizonytalanságát, ami szélesebb 95%-os konfidencia intervallumokban nyilvánult meg.

A Lorentz eloszlást feltételező robusztus regresszió mérsékelten javította a becslés pontosságát a normális eloszlást feltételező hagyományos regresszióhoz képest. Az általunk használt görbeillesztő szoftverrel robusztus regresszió esetében nem lehetett súlyozást alkalmazni.

Összefoglalva, a vizsgált görbeillesztési módok és beállítások közül az RRM pontosságára a legnagyobb hatást a súlyozás gyakorolta, míg a legkisebbet az adatok eloszlására vonatkozó feltételezés (Gauss- vagy Lorentz-féle). Legutóbbi *ex vivo* vizsgálatunk adatainak RRM-mel való elemzése szempontjából a legjobb eredményt a súlyozás mellőzése adta individuális illesztési mód alkalmazása mellett.

4. Megbeszélés

4.1. Az *in silico* eredmények értelmezése

In silico vizsgálatunkban az FSCPX (irreverzibilis A₁ receptor antagonist) és az NBTI (adenozin transzport gátló) – hatásaik szintjén megnyilvánuló – paradox interakcióját igyekeztünk jobban megérteni. Munkacsoportunk először 2013-ban írta le, hogy tengerimalac bal pitvaron az FSCPX előkezelés növeli az adenzin E/c görbe maximumát, ha NBTI is jelen van. A mostani *in silico* vizsgálatunk szerint ez a paradox interakció két egyidejű, additív, de egymástól független okra vezethető vissza. Az egyik ok az a jelenség, ami az RRM alapját is képezi, vagyis hogy az interstitialis adenzin többlet hatása az adenzin (hagyományos módon felvett) E/c görbéjére attól függ, hogy endogén eredetű-e (ami a E/c görbe felvétele előtt halmozódott fel), vagy pedig exogén-e (ami a E/c görbéhez beadott adenzin csökkent bomlása miatt maradt vissza): előbbi deprimálja és jobbra tolja, utóbbi balra tolja az adenzin E/c görbét. Ezt az okot a munkacsoport már korábban is felvetette. A másik ok pedig az FSCPX és az NBTI hatásai közötti interferencia, amelyet a munkacsoport először korábbi *in silico* eredmények alapján hozott gyanúba, majd legutóbbi *ex vivo* eredményeink alapján fogalmazott meg pontosabban. A pontosítás azt jelentette, hogy míg korábban elképzelhetőnek tűnt az NBTI hatásainak általános (FSCPX általi) gátlása, ami egyaránt érintette volna az endogén és az exogén adenzinra kifejtett hatást, addig később az NBTI-nek már csak az endogén adenzinra gyakorolt hatása került okként szóba. A mostani *in silico* vizsgálat megerősítette ez utóbbi vizsgálat következtetéseit, miszerint az FSCPX (az A₁ receptor antagonizálásán túl) az endogén adenzin NBTI általi akkumulációját gátolja.

Az *in silico* vizsgálat elméleti szempontból érdekes eredménye, hogy az agonizmus operatív modelljének E_m paramétere a korábbi elképzeléseinkhez képest meglepően nagy mértékben befolyásolja a torzult (c_{bias} hatását is tükröző) E/c görbék viselkedését.

In silico vizsgálatunk további eredménye annak valószínűsítése, hogy az NBTI általi ENT1 blokádnem szünteti meg teljesen a befelé irányuló transzmembrán adenzin transzportot a tengerimalac pitvari myocardiumon. Ez összhangban van mások azon eredményeivel, miszerint a szívben többféle nukleozid transzporter is működik az

ekvilibratív és NBTI-szenzitív ENT1-en kívül.

4.2. Az *ex vivo* eredmények értelmezése

Fontos – és egyben önkritikus – annak megállapítása, hogy az összes korábbi vizsgálatban a munkacsoport abból a két feltételezésből indult ki az RRM alkalmazása során, hogy az azonos koncentrációhoz tartozó adatpontok (replikátumok) szórása normális eloszlást követ, továbbá ez a szórás azonos mértékű a különböző koncentrációk esetében. Ez a megközelítés azonban kizárólag azon a szakmai közvélekedésen nyugodott, mely szerint ez a két feltételezés általában igaz a biológiai rendszerekből származó (tehát multikauzális), nem transzformált (legfeljebb normalizált vagy logaritmált) adatokra. *Ex vivo* vizsgálatunk egyik célja tehát ennek a kérdésnek a megnyugtató tisztázása volt a mi biológiai rendszerünkben és kísérleti módszereink alkalmazása mellett, vagyis annak felderítése, hogy más feltételezésekből kiindulva javítható-e adatainkon az RRM becsléseinek pontossága illetve megbízhatósága (ezáltal az RRM használhatósága). Másik célunk a görbeillesztés két módjának, az individuális és globális regresszióknak az összehasonlítása volt. Az összetartozó görbepárok globális regresszióját a klasszikus individuális illesztés továbbfejlesztésének tartják, ami képes csökkenteni az illesztés bizonytalanságát.

Az értekezést megalapozó *ex vivo* vizsgálat illesztésre szánt E/c görbéinek felvételéhez három jól bevált vegyületet választottunk (NECA, CPA, CHA). A NECA mind az A₁, mind az A₂ adenosin receptor típust stimulálja, míg a CPA és a CHA szelektív agonistái az A₁ receptornak, ami a myocardium fő adenosin receptor típusa. A NECA, CPA és CHA, szintetikus vegyületek lévén, lényegesen rosszabb szubsztrátjai az adenosint bontó illetve tovább építő enzimeknek, valamint a nukleozidok transzportereinek, mint maga az adenosin, ezért a velük készített E/c görbék alkalmasabbak kvantitatív kiértékelésre, mint az adenosin E/c görbéi. A NECA, a CPA és a CHA által stimulált A₁ receptor ugyanakkor valamelyest eltérő preferenciával kapcsolódik a sejtmembránban jelen lévő különböző G proteinekhez, ezért vizsgálatainkat indokoltnak tartottuk mindhárom szintetikus agonistával elvégezni.

Ex vivo vizsgálatunk egyik megállapítása az, hogy az általánosan elfogadott nézet, mely szerint biológiai kísérletek eredményeinek elemzésekor az adatok normalitásából és heteroszkedaszticitásából érdemes kiindulni, megállja a helyét a mi

ex vivo kísérleti elrendezésünk által nyújtott adatok RRM-mel való kiértékelése esetén is. Ebből következően az RRM használata során az elsőként választandó megközelítés a súlyozás nélküli hagyományos (ordinary) regresszió. A becslések pontossága szempontjából a robusztus regresszió is jó választás (ha a görbeillesztő szoftverben van rá lehetőség), mi több, sokszor pontosabb eredményt szolgáltat, mint a hagyományos illesztés. A hagyományos regresszió mellett szól azonban, hogy a robusztus regresszió a becslésekhez nem ad meg 95%-os konfidencia intervallumot, amellyel a görbeillesztés precizitása (és ezáltal a megbízhatósága) megítélhető lenne.

Ex vivo vizsgálatunk további, meglepő eredménye ugyanakkor, hogy a klasszikus individuális görbeillesztés pontosabb és megbízhatóbb (noha kevésbé kényelmes) eszköze az RRM kivitelezésének, mint a modernebb globális regresszió. Az RRM számára tehát az individuális illesztés a jó választás.

5. Összefoglalás

Az értekezést megalapozó *in silico* vizsgálataink során egyrészt megállapítottuk, hogy az agonizmus operatív modelljének E_m paramétere a korábbi elképzeléseinkhez képest meglepő mértékben befolyásolja E/c görbéink viselkedését. Ezen túlmenően *in silico* megfigyeléseinkkel megerősítettük az FSCPX és az NBTI hatásainak a mi kísérleti rendszerünkben fellépő interakciójára vonatkozó hipotézisünket, melyet néhány korábbi *ex vivo* vizsgálatunk eredményei alapján állítottunk fel. Hipotézisünk szerint az FSCPX azon túl, hogy közismert A_1 receptor antagonistája, mérsékelni képes az ENT1 típusú nukleozid transzport gátló NBTI által okozott interstitialis adenzin felhalmozódást. Ennek az interakciónak a mechanizmusára vonatkozó *in silico* eredményeink szerint az FSCPX csak az endogén adenzin interstitialis akkumulációját gátolja (az exogén adenzinét pedig nem). További *in silico* eredményünk, hogy az NBTI feltehetően nem állítja le teljesen a sejtmembránon keresztüli, befelé irányuló adenzin transzportot tengerimalac pítvaron.

A jelen disszertációt megalapozó *ex vivo* kísérleti munka fő eredménye, hogy az RRM legpontosabb becsléseit súlyozás nélküli individuális illesztéssel lehet elérni, csaknem függetlenül attól, hogy Gauss eloszlást feltételező hagyományos (ordinary) vagy Lorentz eloszlásra optimalizált robusztus (robust) regressziót alkalmazunk-e. A megbízhatóság szempontjából ugyanakkor érdekesebb hagyományos regressziót végezni, mivel csak ennek révén juthatunk a görbeillesztés precizitásáról informáló 95%-os konfidencia intervallumokhoz (a becslések mellé). Vizsgálataink azt is megmutatták, hogy az RRM – az általa nyújtott lehetőségekhez képest – könnyen alkalmazható eljárás, ami nem igényel sem speciális, nagy kapacitású görbeillesztő szoftvert, sem magas szintű ismereteket a regresszióanalízis területén.

6. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki Dr. Szilvássy Zoltán egyetemi tanárnak, egyetemünk rektorának, hogy lehetővé tette munkám elvégzését az általa vezetett intézetben (DE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet).

Köszönöm témavezetőm, Dr. Gesztelyi Rudolf egyetemi docens (DE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet) segítségét munkám során.

Köszönöm témavezetőm csapatának a sok segítséget, amit egy klinikus számára adtak, hogy ez az értekezés létrejöhhessen: Dr. Erdei Tamás, Dr. Lampé Nóra és Viczján Gábor PhD hallgatóknak, valamint Juhász Ildikó asszisztensnek.

Köszönetet mondok munkahelyem vezetőinek, Dr. Balla József egyetemi tanárnak (DE KK Belgyógyászati Intézet) és Dr. Tarr Tünde egyetemi docensnek (DE KK Belgyógyászati Intézet C Épület), továbbá közvetlen kollégáimnak.

Köszönöm családomnak, különösen férjemnek, Dr. Varga Balázsnak, a sok segítséget, a gyermekeimnek, hogy türelmesek voltak, édesanyámnak, édesapámnak, anyósomnak és apósomnak, hogy a felkészülési idő alatt végig támogattak.

PhD munkám anyagi feltételeit a „HU-MATHS-IN – Magyar Ipari Innovációs Matematikai Szolgáltatási Hálózat tevékenységének elmélyítése” pályázat (EFOP-3.6.2-16-2017-00015) biztosította. További segítséget jelentett az Innovációs és Technológiai Minisztérium által meghirdetett Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program (NKFIH-1150-6/2019) a Debreceni Egyetem Terápiás célú fejlesztések tématerületi programja keretében, továbbá „A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban” projekt keretében az Európai Unió támogatásával az Európai Regionális Fejlesztési Alap (GINOP-2.3.4-15-2016-00002), valamint a Tématerületi Kiválósági Program 2019 (ED_18-1-2019-0028).



Nyilvántartási szám: DEENK/188/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szabó Adrienn Mónika

Neptun kód: AAVLFR

Doktori Iskola: Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szabó, A. M.**, Viczján, G., Erdei, T. D., Simon, I., Kiss, R., Szentmiklósi, J. A., Juhász, B., Papp, C., Zsuga, J., Pintér, Á., Szilvássy, Z., Gesztelyi, R.: Accuracy and Precision of the Receptorial Responsiveness Method (RRM) in the Quantification of A1 Adenosine Receptor Agonists.
Int. J. Mol. Sci. 20 (24), 6264-6277, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20246264>
IF: 4.183 (2018)
2. **Szabó, A. M.**, Erdei, T. D., Viczján, G., Kiss, R., Zsuga, J., Papp, C., Pintér, Á., Juhász, B., Szilvássy, Z., Gesztelyi, R.: An Advanced in silico Modelling of the Interaction between FSCPX, an Irreversible A1 Adenosine Receptor Antagonist, and NBTI, a Nucleoside Transport Inhibitor, in the Guinea Pig Atrium.
Molecules. 24 (12), 1-16, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24122207>
IF: 3.06 (2018)

További közlemények

3. Wachal, Z., Bombicz, M., Priksz, D., Hegedűs, C., Kovács, D. K., **Szabó, A. M.**, Kiss, R., Németh, J., Juhász, B., Szilvássy, Z., Varga, B.: Retinoprotection by BGP-15, a Hydroxamic Acid Derivative, in a Type II Diabetic Rat Model Compared to Glibenclamide, Metformin, and Pioglitazone.
Int. J. Mol. Sci. 21 (6), 1-19, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21062124>
IF: 4.183 (2018)





4. Erdei, T. D., **Szabó, A. M.**, Lampé, N., Szabó, K., Kiss, R., Zsuga, J., Papp, C., Pintér, Á., Szentmiklósi, J. A., Szilvássy, Z., Juhász, B., Gesztelyi, R.: FSCPX, a chemical widely used as an irreversible A1 adenosine receptor antagonist, modifies the effect of NBTI, a nucleoside transport inhibitor, by reducing the interstitial adenosine level in the guinea pig atrium. *Molecules*. 23 (9), 1-17, 2018.
DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23092186>
IF: 3.06
5. Varga, B., Priksz, D., Lampé, N., Bombicz, M., Kurucz, A., **Szabó, A. M.**, Pósa, A., Szabó, R., Kemény-Beke, Á., Gálné Remenyik, J., Gesztelyi, R., Juhász, B.: Protective Effect of Prunus Cerasus (Sour Cherry) Seed Extract on the Recovery of Ischemia/Reperfusion-Induced Retinal Damage in Zucker Diabetic Fatty Rat. *Molecules*. 22 (10), [1-12], 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules22101782>
IF: 3.098
6. Varga, B., Gesztelyi, R., Bombicz, M., Haines, D. D., **Szabó, A. M.**, Kemény-Beke, Á., Antal, M., Vecsernyés, M., Juhász, B., Tósaki, Á.: Protective Effect of Alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone (α -MSH) on the Recovery of Ischemia/Reperfusion (I/R)-Induced Retinal Damage in A Rat Model. *J. Mol. Neurosci*. 50 (3), 558-570, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12031-013-9998-3>
IF: 2.757
7. Zsuga, J., Gesztelyi, R., Kemény-Beke, Á., Fekete, K., Mihálka, L., **Szabó, A. M.**, Kardos, L., Csiba, L., Bereczki, D.: Different effect of hyperglycemia on stroke outcome in non-diabetic and diabetic patients: a cohort study. *Neurol. Res*. 34 (1), 72-79, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1179/1743132811Y.0000000062>
IF: 1.182

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 21,523

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
7,243**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2020.06.12.

