

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A receptoriális válaszkészség módszer (RRM) nyújtotta új
lehetőségek az A₁ adenozinerg és M₂ muszkarinerg szabályozó
mechanizmusok vizsgálatában eu- és hyperthyreoid
tengerimalac pitvaron**

Dr. Pák Krisztián

TÉMAVEZETŐ: Dr. Gesztelyi Rudolf



DEBRECENI EGYETEM
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2015.

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A receptoriális válaszkészség módszer (RRM) nyújtotta új
lehetőségek az A₁ adenozinerg és M₂ muszkarinerg szabályozó
mechanizmusok vizsgálatában eu- és hyperthyreoid
tengerimalac pitvaron**

Dr. Pák Krisztián

TÉMAVEZETŐ: Dr. Gesztelyi Rudolf

DEBRECENI EGYETEM
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2015.

**A receptoriális válaszkészség módszer (RRM) nyújtotta új lehetőségek
az A₁ adenzinerg és M₂ muszkarinerg szabályozó mechanizmusok vizsgálatában
eu- és hyperthyreoid tengerimalac pitvaron**

értekezés tézisei a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében a gyógyszerészeti
tudományok tudományágban

Írta: Dr. Pák Krisztián gyógyszerész

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

Témavezető: Dr. Gesztelyi Rudolf, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Ábrahám István, az MTA doktora
Dr. Csonka Csaba, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem, GYTK, Gyógyszerhatástani Tanszék könyvtára
2015. október 28. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna, az MTA doktora
Dr. Bányász Tamás, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Ábrahám István, az MTA doktora
Dr. Csonka Csaba, PhD
Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna, az MTA doktora
Dr. Bányász Tamás, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem, ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2015. október 28. 13 óra

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	1
1.1. Célkitűzés	1
1.2. Adenozin és adenozin receptorok.....	2
1.3. A receptor rezerv	3
1.4. Thyreoid állapot.....	4
1.5. A szív interstitialis adenozin szintjének jelentősége	4
1.6. Interakció az A ₁ adenozinerg és M ₂ kolinerg rendszerek között.....	6
2. Anyagok és módszerek.....	7
2.1. Vegyszerek és oldatok	7
2.2. Állatok és preparátumok.....	7
2.3. Vizsgálati elrendezések	8
2.4. Az 1. vizsgálat csoportjai és protokolljai	8
2.5. A 2. vizsgálat csoportjai és protokolljai	9
2.6. Az E/c görbék empirikus jellemzése	10
2.7. Az NBTI és a DCF torzító hatásának kvantifikálása.....	10
2.8. Az NBTI és a DCF által torzított hatás értékek korrekciója	11
2.9. Az adatok elemzése	13
3. Eredmények	14
3.1. Az 1. vizsgálat eredményei.....	14
3.1.1. Az 1-es és 2-es protokollok korrekció előtti adenozin E/c görbéi.....	14
3.1.2. CPA E/c görbék	14
3.1.3. Az 1-es és 2-es protokollok korigált E/c görbéi	15
3.2. A 2. vizsgálat eredményei	16
3.2.1. MC E/c görbék.....	16
3.2.2. CPA E/c görbék	17
3.2.3. Korigált MC és CPA E/c görbék	18
4. Megbeszélés	19
4.1. Az 1. vizsgálat eredményeinek értelmezése.....	19
4.2. A 2. vizsgálat eredményeinek értelmezése.....	21
5. Összefoglalás	25
6. Köszönetnyilvánítás.....	26

1. Bevezetés

1.1. Célkitűzés

Az alacsony jövedelmű országokban napjainkban is az alapvető szükségletek kielégítésében mutatkozó hiány és a fertőző betegségek befolyásolják leginkább a várható élettartamot. A magasabb jövedelmű országokban viszont a halálozási statisztikák élén már a kardiovaszkuláris betegségek állnak, mint a legjelentősebb haláloki csoport.

A szív- és érrendszeri betegségek terén a gyorsan fejlődő terápiás lehetőségek ellenére az ischaemiás szívbetegség a leggyakoribb halálok, amely 7,4 millió halálesetért volt felelős 2012-ben. A szív endogén protektív mechanizmusainak jobb megismerése alapvető az ischaemiás szívbetegség elleni új terápiás stratégiák kifejlesztéséhez.

Munkám során az első célkitűzésem munkacsoportunk azon hipotézisének tesztelése volt, miszerint egy A_1 adenzin receptor (A_1 receptor) agonista tulajdonságú szer kisebb mértékben csökkenti a pitvari kontrakciós erőt hyperthyreosisban, mint euthyreoid állapotban. Ehhez egy olyan modellre volt szükség, amelyben meghatározható az adenzin direkt negatív inotróp hatására vonatkozó A_1 adenzin receptor rezerv és annak változása tiroxin (T_4) kezelés hatására. Speciális protokollok alkalmazásával olyan koncentráció-hatás (E/c) görbéket vettünk fel, amelyekben kivédtük az exogén adenzin gyors sejten belüli eliminációját, majd ezek kiértékelésekor a hagyományos eljárásokon kívül felhasználtuk az ún. receptorális válaszkészség módszert (RRM) is. Az RRM segítségével korrigáltuk azt a torzulást, amit az endogén adenzin felhalmozódása okozott (ami szükségszerűen fellép az exogén adenzin farmakológiai védelme következtében).

Másik céloom az volt, hogy betekintést nyerjünk az adenzin-dezamináz (ADA) gátlásának funkcionális következményeibe a pitvari A_1 adenzinerg és M_2 muszkarinerg rendszer által mediált pitvari direkt negatív inotróp hatás tekintetében eu- és hyperthyreoid körülmények között. Az ADA gátlása megemeli az endogén adenzin szintjét és ezáltal A_1 receptoron keresztül mediálódó folyamatokat indít el, feltételezésünk szerint azonban emellett fokozza az A_1 adenzinerg rendszer jelátviteli hatékonyságát is. Ez utóbbi igazolásához az RRM segítségével korrigálnunk kellett az endogén adenzin felhalmozódása által okozott torzulásra, amihez szükség volt az M_2 muszkarinerg rendszer által mediált direkt negatív inotróp hatás vizsgálatára is. További céloom az ADA gátlás hatására bekövetkező interstitialis adenzin-szint emelkedés meghatározása volt az RRM

segítségével, valamint ennek összehasonlítása a nukleozid transzport blokádnál által kiváltott interstitialis adenzin-szint növekedéssel, mindezeket eu- és hyperthyreoid állapotban.

1.2. Adenzin és adenzin receptorok

Az adenzin nemcsak alapvető biokémiai folyamatokban játszik fontos szerepet (mint pl. az energiáttranszfer), hanem szignál funkciója is van (az adenzin receptorok endogén agonistája).

Az adenzin az adenzin-trifoszfát (ATP) prekürzora és bomlásterméke. Ezzel összhangban az adenzin megemelkedett szintje a sejt kimerülésének indikátora.

Az adenzin három úton eliminálódhat az interstitialis folyadékából: 1. adenzin-dezamináz általi bomlás; 2. véráramba történő bekerülés; 3. bizonyos szövetekbe (endothelium, myocardium) való felvétel.

A szívben többnyire ekvibratív nukleozid transzporterek találhatók (ENT), főleg ENT 1 típus, amely nitrobenzylthioinosine-nal (NBTI) gátolható. Ennek következtében a cardiomyocyták adenzin transzportját legfőképpen az intra- és extracelluláris adenzin koncentráció különbsége határozza meg.

Az adenzin szabályozó hatásai elsősorban sejt felszíni adenzin receptorok által mediálódnak (A_1 , A_{2A} , A_{2B} és A_3 típus). Az A_1 receptor komplex szabályozó funkcióit majdnem minden szöveten kifejti, beleértve a myocardiumot is, ahol az A_1 a legjelentősebb adenzin receptor típus. A myocardialis A_1 receptorok protektív és reparatív funkciók inicializálásában vesznek részt. Ez magában foglalja azokat a negatív tróp hatásokat is, amelyek csökkentik az energiatfelhasználást és így megelőzik, illetve mérséklék a szív ischaemia-reperfúzió okozta károsodását.

Az A_1 adenzinerg rendszer farmakológiai aktiválása egy reménytelen, bár még szerényen kihasznált lehetőség, amely preventív és terápiás hatással kecsegtet számos kardiovaszkuláris betegség esetén, beleértve az ischaemiás szívbetegséget és bizonyos típusú arrhythmákat.

A szív A_1 receptorai által mediált negatív tróp hatások, úgymint a negatív inotróp hatás, a pitvarokon és a kamrákon egyaránt kiválthatók. Kamrán az A_1 receptor agonisták csak indirekt negatív hatást képesek kifejteni, vagyis csak a pozitív inotróp szerek hatását csökkentik. Ezzel szemben a pitvaron az A_1 agonisták a legtöbb species esetében képesek

a kontrakciós erőt a nyugalmi szint alá csökkenteni (direkt negatív inotróp hatás), így tengerimalacon és emberen is.

Következésképpen számos A_1 receptor agonista, A_1 receptor serkentő és az endogén adenozin szintjét növelő szer áll preklinikai és klinikai vizsgálat alatt, illetve került bevezetésre számos indikációs területen, mint antiarrhythmias, antianginás, antidiabetikus vagy antinociceptív gyógyszer. Mivel ezek a szerek direkt vagy indirekt módon ugyanazon a célponton fejtik ki hatásukat (A_1 receptor), a fő biztonsági kihívás az, hogy úgy biztosítsák a kívánt hatásokat, hogy közben minimalizálják a nemkívánatosakat. Általánosságban elmondható, hogy a direkt negatív inotrópia nem kívánt hatás, mivel a pitvarok nyugalmi kontrakciós erejének csökkenése csak hátránnyal jár.

1.3. A receptor rezerv

A receptor rezerv fogalma a tradicionális receptor elmélet keretein belül lett definiálva. Arra a jelenségre utal, hogy a teljes receptor populáció egy frakciójának stimulálása is kiválthatja a maximális hatást. A receptor rezerv nagysága függ az agonistától (hatékonyság), a szövettől (jelerősítő képesség) és magától a vizsgált hatástól is (aktivált jelerősítő útvonalak). Így a legáltalánosabb értelemben vett receptor rezerv nem más, mint az agonista hatáskiváltó képességének (intrinzik hatékonyság) és a receptorok (és posztreceptorális szignalizációjuk) jelerősítő képességének eredője. Mivel a receptor rezerv nagyon érzékeny az agonista intrinzik hatékonyságára, csak teljes (full) agonisták használata során figyelhető meg. Ha a receptor rezervet különböző szöveteken ugyanazzal az agonistával határozzuk meg, akkor az eredmény felhasználható a receptorok jelerősítő képességének összehasonlítására. A kísérletes gyakorlatban a legegyszerűbb jelzője a nagy jelerősítő képességnek (és így a nagy receptor rezervnek) az, hogy a receptor populáció még egy kis részének stimulálása is képes kiváltani a maximális hatást.

A fentebb említettek alapján a nagy hatékonyságú agonisták általában a legtöbb szöveten kifejtik hatásukat, amelyek expresszálják az adott receptort. Ezzel szemben az alacsony hatékonyságú agonisták csak a nagy receptor rezervvel rendelkező szöveteken képesek hatást kiváltani. Így a kis hatékonyságú agonisták biztosítani tudják a szöveti szelektivitást abban az értelemben, hogy nem képesek biológiailag szignifikáns hatás elérésére olyan szöveteken, ahol kicsi a receptor rezerv.

Korábbi vizsgálataink során figyelemre méltó A_1 receptor rezervet találtunk a direkt negatív inotróp hatásra nézve szintetikus A_1 receptor agonistákkal és adenzinnal. A receptor rezerv nagyságát világosan mutatja az a megfigyelés, hogy az FSCPX (irreverzibilis A_1 receptor antagonist) nem volt képes szignifikánsan csökkenteni a szintetikus agonisták és az adenzin által kiváltott maximális direkt negatív inotróp hatást. Így az A_1 receptorokat stimuláló szerek mellékhatásai között a pitvar gyengítése az egyik lehetséges (és egyben igen fontos) mellékhatás.

1.4. Thyreoid állapot

A thyreoid állapot számos szabályozó mechanizmust befolyásol, beleértve az A_1 receptort is. A thyreoid hormonok (T_3 , T_4) többek között jelentős mértékben csökkentik az A_1 agonisták direkt negatív inotróp hatását. A hyperthyreosis egy olyan patológiás állapot, melynek során egy sor metabolikus folyamat fokozódik, emiatt nő az oxigén- és a tápanyag felhasználás a szövetekben, ami növeli a szív munkáját. Következésképpen a jelentős mértékű thyreoid hormon-szint növekedése fokozza a pangásos szívelégtelenség, az ischaemiás szívbetegségek, valamint az arrhythmiák kockázatát, ezáltal növeli a kardiovaszkuláris mortalitást. E tények fényében a thyreoid hormonok által elnyomott A_1 adenzinerg rendszer aggodalomra adhat okot. Éppen ezért fontos olyan lehetőségek után kutatni, amelyek képesek az elnyomott A_1 adenzinerg rendszer működését fokozni hyperthyreosisban.

1.5. A szív interstitialis adenzin szintjének jelentősége

A myocardialis A_1 receptorok protektív és reparatív folyamatok indukálásában vesznek részt, ideértve a negatív inotróp hatásokat is, amelyek csökkentik az energiafelhasználást és ezáltal hozzájárulnak a szív ischaemiával szembeni védelméhez. Míg a nyugalmi interstitialis adenzin-szint nem bír érdemleges receptorális hatással, ennek emelkedése beindítja az adenzinerg jelátvitelt, amellyel iniciálja a szív védekező mechanizmusait.

Egy lehetőség az interstitialis adenzin koncentráció befolyásolására az adenzin-dezamináz enzim aktivitásának mérséklése, amellyel gátoljuk az adenzin inozinná történő átalakítását. Az ADA gátlása növeli az endogén adenzin koncentrációját mind intra-, mind az extracellulárisan, de kivédi az exogén adenzin bontását is, fokozva ezzel a beadott adenzin hatását.

A munkacsoport egy korábbi vizsgálata során arra a következtetésre jutott, hogy az ADA gátlás növeli az A_1 adenzinerg rendszer jelerősítő képességét a direkt negatív inotrópia tekintetében hyperthyreoid tengerimalac pitvaron. Mivel az ADA gátlása növeli az adenzin szintjét és így fokozza az összes A_1 receptor mediálta folyamatot, az ADA gátlás jelátviteli hatékonyságot növelő hatása nehezen érhető tetten. További vizsgálatához speciális megközelítésre van szükség, amely alkalmas az ADA gátlás funkcionális következményeinek differenciálására az A_1 receptor mediálta direkt negatív inotrópiát illetően.

Egy másik módszer az interstitialis adenzin szint manipulálására az adenzin sejtmembránon keresztüli transzportjának gátlása. A metabolikusan intakt myocardiumban a nettó adenzin képződés helye az interstitium, míg a nettó adenzin elimináció helye a sejtek belseje, ezért a nettó adenzin transzport a cardiomyocyták belseje felé irányul. A szívben a transzmembrán adenzin áramlás majdnem kizárólag ENT1 csatornákon keresztül történik. A munkacsoport előző eredményei alapján az NBTI növeli az interstitialis adenzin szintjét tengerimalac pitvaron, mely hatás még kifejezettebb hyperthyreoid állapotban.

A működő szívben az interstitialis adenzin-szint változása nem mérhető megfelelő pontossággal a jelenleg elterjedt módszerekkel (legalább is a mi igényeinkhez képest), melynek fő oka az adenzin rövid féléletideje. Megfelelő vizsgálati körülmények között azonban a receptorális válaszkészség módszer (RRM) – amely egy nemrégiben kifejlesztett, bár a klasszikus farmakológiában gyökerező módszer – alkalmas lehet a probléma megoldására. Az RRM két egymással interakcióban lévő agonista viselkedésének egyszerűsített matematikai modelljén alapul, ahol az agonisták ugyanazt a válaszadási kapacitást „fogyasztják”. Ily módon az RRM módszer lehetővé teszi egy agonista akut koncentrációemelkedésének kvantifikálását koncentráció-hatás (E/c) görbék felvétele révén. Ezeket az E/c görbéket vagy ugyanazzal az agonistával kell felvenni, mint aminek a koncentrációnövekedését meg akarjuk határozni, vagy egy olyan másikkal, amelyik lényegében ugyanazt a jelátvitelt használja az adott szöveten. A módszer hátránya két különböző agonista esetén az, hogy a meghatározott többlet koncentráció csak egy a

keresett agonista koncentrációjával ekvieffektív koncentráció. Az RRM egyedülálló sajátossága azonban, hogy információt nyújt az adott agonista receptorközeli koncentrációjáról, ezáltal pedig arról a szöveti kompartmentről, amely egyébként nehezen hozzáférhető egy működő (pláne mozgásban lévő) szerv esetében. Jóllehet az RRM elvben minden receptor esetén alkalmazható, az A_1 receptor különösen alkalmas erre a célra, mivel deszenzitizálódása meglehetősen kismértékű a vizsgálat ideje alatt.

1.6. Kapcsolat az A_1 adenzinerg és M_2 muszkarinerg rendszerek között

A szívben az A_1 és M_2 receptorok az uralkodó receptor típusok az adenzin és az acetilkolin megkötését illetően. A pitvaron az A_1 és M_2 receptorok is $G_{i/0}$ proteinekhez kapcsolódnak, ezáltal mindkettő képes a muszkarinos (inwardly rectifying) kálium csatornák megnyitására, valamint gátolják az adenilcikláz aktivitást, következményesen blokkolnak minden cAMP-függő jelátviteli útvonalat. Ennek következtében mind az A_1 , mind az M_2 receptorok képesek direkt negatív inotróp hatás kiváltására pitvaron. Így, bár különböző receptorokról van szó, agonistáik mégis nagyrészt ugyanazokat a jelátviteli útvonalakat használják, különösen a direkt negatív inotróp hatás tekintetében. További hasonlóság a két receptor között, hogy mindkettő thyreoid hormonok (T_3 , T_4) szabályzó hatása alatt áll, jóllehet tudásunk ezen a téren még korántsem teljes.

2. Anyagok és módszerek

2.1. Vegyszerek és oldatok

Az alábbi vegyszereket használtuk: L-tiroxin nátrium pentahidrát (T_4), adenzin (nem szelektív adenzin receptor full agonista), N⁶-ciklopentiladenozin (CPA; szelektív A₁ adenzin receptor full agonista); acetyl- β -metilkolin klorid (metakolin: MC; nem szelektív muszkarin receptor full agonista); 8-ciklopentil-1,3-dipropilxantin (CPX; szelektív kompetitív A₁ adenzin receptor antagonist) és FSCPX (8-cyclopentyl-N³-[3-(4-(fluorosulfonyl)benzoyloxy)propyl]-N¹-propylxanthine); S-(2-hidroxi-5-nitrobenzil)-6-tioinozin (NBTI; szelektív nukleozid transzporter gátló, ENT 1 típust gátol) a Sigmától (St. Louis, MO, USA), valamint pentostatin (2'-dezoxikoformicin: DCF; szelektív adenzin-dezamináz gátló), ami Wyeth Pharmaceuticals (Collegeville, PA, USA) ajándéka volt. A kísérleteket módosított Krebs-Henseleit pufferrel (Krebs oldat) végeztük.

2.2. Állatok és preparátumok

Az állatok tartása és feldolgozása összhangban volt a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottságának Etikai Kódexével (3/2012/DE MÁB.). Kísérleteinkhez 600-900 g testtömegű hím tengerimalacokat használtunk fel.

Az állatok egy csoportja napi 330 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ip.) Na L-tiroxin pentahidrátot kapott 8 napon keresztül, míg a többi állat 8 napon át a tiroxin oldószerét (ip.) kapta. Az állatokat a kilencedik napon guillotine-al dekapituláltuk. A bal pitvarokat gyorsan eltávolítottuk és 10mN nyugalmi feszülés mellett 10 ml-es, Krebs oldatot tartalmazó (95% O₂ és 5% CO₂) szervkádakban (TSZ-04, Experimetria) függesztettük fel (36°C; pH 7.4).

A pitvarok platinaelektrodokkal ingereltük (3 Hz, 1 ms, a küszöbfeszültség kétszerese) programozható stimulátorok (ST-02, Experimetria, Budapest) és erősítő (PST-02, Experimetria, Budapest) segítségével. A kontrakciós erőt az izometriás összehúzódnások 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. Vizsgálati elrendezések

Kutatásaink a két fő cél és a jelen tézishoz felhasznált két publikáció alapján két részre osztottunk: 1. vizsgálat és 2. vizsgálat. A protokollok lényege mindkét vizsgálat esetén két-három koncentráció-hatás (E/c) görbe felvétele volt, tengerimalac pitvarokon. Két E/c görbe között, in vitro kezeléseket végeztünk. Mindkét tanulmány esetén a direkt negatív inotrópiát vizsgáltuk, mivel ez egy erős, jól mérhető ugyanakkor remekül reprodukálható olyan hatás, amely pitvari myocardium A₁ receptorain mediálódik. Az izolált és ingerelt tengerimalac pitvarok egy nagymértékben leegyszerűsített modellt alkotnak, ahol a különböző agonisták hatása, pusztán a pitvari kontrakciós erő csökkenésében manifesztálódnak.

2.4. Az 1. vizsgálat csoportjai és protokolljai

Az oldószer és a T₄ kezelt pitvarokat 6-6 random csoportra osztottuk (az in vivo oldószer és T₄ kezelt csoportokat S-el vagy T-vel jelöltük a csoportok neveiben). Mindegyik csoportban egy a négy protokollból volt elvégezve. Alkalmazott csoportok és protokollok: S1 és T1 a protokoll 1-hez (FSCPX adenzin E/c görbéjére kifejtett hatásának demonstrálására); S2 és T2 a protokoll 2-höz (adenozinnal kiváltott A₁ receptor rezerv meghatározása); S3-kontrol, S3-NBTI, T3-kontrol és T3-NBTI csoportok a protokoll 3-hoz (adatok gyűjtése a c_x meghatározásához, ahol a c_x az NBTI jelenlétében felhalmozódó, endogén adenzinnal ekvifektív CPA koncentráció); S4-kontrol, S4-FSCPX, T4-kontrol és T4-FSCPX (adatgyűjtés a c_x negatív inotróp hatásának kiszámolásához FSCPX előkezelt pitvarok esetén).

1. Protokoll: Krebs oldatos inkubációt követően kumulatív adenzin E/c görbék felvétele következett. Aztán, egy 15 perces mosást követően 10 μM FSCPX (szelektív, irreverzibilis A₁ receptor antagonist) kezelésnek vetettük alá 45 percig, majd 75 perces Krebs oldattal történő mosás következett. Ezután egy kumulatív adenzin E/c görbét vettünk fel.

2. Protokoll: Krebs oldatos inkubációt követően kumulatív adenzin E/c görbét vettünk fel. Aztán, egy 15 perces mosást követően 10 μM NBTI (szelektív nukleozid transzport gátló) kezelésnek vetettük alá 15 percig. Ezt követően kumulatív E/c görbék

felvétele következett 10 μ M NBTI (S2-NBTI és T2-NBTI görbék). Ezután egy 20 perces mosás következett, amelyet 45 perc 10 μ M FSCPX kezelés követett, majd egy 60 perces Krebs oldatos mosás. Ezután a pitvarok 10 μ M NBTI-vel inkubálódtak 15 percen keresztül, majd egy újabb kumulatív E/c görbék felvétele következett 10 μ M NBTI jelenlétében.

3. protokoll: Krebs oldatos inkubációt követően kumulatív adenzin E/c görbék felvétele következett. Egy 15 perces mosást követően a pitvarokat random két csoportra osztottuk. A pitvarok a kontroll csoportban 10 μ l DMSO-t, míg a pitvarok az NBTI csoportban 10 μ M NBTI-t kaptak 15 percen keresztül. Ezután kumulatív E/c görbék lettek CPA-val (szelektív A₁ receptor full agonista) felvéve 10 μ l DMSO vagy 10 μ M NBTI jelenlétében.

4. protokoll: Krebs oldatos inkubációt követően kumulatív adenzin E/c görbék felvétele következett. Egy 15 perces mosást követően a pitvarokat random két csoportra osztottuk. A pitvarok a kontroll csoportban 10 μ l DMSO-t kaptak 45 percen keresztül, amit egy 75 perces mosás követett, míg a pitvarok az FSCPX csoportban 10 μ M FSCPX kezelést kaptak 45 percen át, majd 75 percen keresztül mosódtak. Ezt követően egy kumulatív CPA E/c görbe felvétele következett.

2.5. A 2. vizsgálat csoportjai és protokolljai

Először is, minden pitvar 40 percen keresztül inkubálódott az egyensúlyi állapot létrejöttéig. Ezt egy kumulatív adenzin dózis-hatás görbe felvétele követte.

A mosási időt követően (15 perc Krebs oldattal történő mosás) a pitvarokat a későbbi in vitro kezelésnek megfelelően random módon csoportokra osztottunk. A csoportnevek az alkalmazott in vivo és in vitro kezelésre is utalnak (S- oldószer kezelt, T- T₄ kezelt; Co- kontrol, és az alkalmazott in vitro szer kémiai neve): Az in vitro kezelés 20 perces inkubációt jelent Krebs oldat jelenlétében (S Co, T Co, S Co (CPA), T Co (CPA)) vagy 10 μ M CPX (S CPX, T CPX) vagy 0.1% (v/v) DMSO magában (S DMSO, T DMSO) vagy 10 μ M NBTI (S NBTI, T NBTI) vagy 10 μ M DCF (S DCF, T DCF, S DCF (CPA), T DCF (CPA)) vagy 10 μ M DCF 10 μ M CPX-el (S DCF CPX, T DCF CPX). Végül kumulatív E/c görbét szerkesztettünk MC-al MC (S Co, T Co, S CPX, T CPX, S DMSO, T DMSO, S NBTI, T NBTI, S DCF, T DCF, S DCF CPX, T DCF CPX) vagy CPA-val (S Co (CPA), T Co (CPA), S DCF (CPA), T DCF (CPA)).

Az első E/c görbe esetén az adenzint a (in vitro) kezeletlen A₁ adenzin receptorok válaszkészségének megállapítására használtuk. A második E/c görbéhez MC vagy CPA (két relatíve stabil agonistája az M₂ vagy A₁ receptorokat illetően) szereket használtunk azért, hogy információt kapjunk a különböző in vitro kezelés hatásáról az M₂ és A₁ receptorok válaszát illetően.

2.6. Az E/c görbék empirikus jellemzése

A kísérletek során megfigyelt hatást, a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenéseként definiáltuk. Mind az individuális, mind az átlagolt görbékre a Hill egyenlet illesztettük:

$$E = E_{\max} \cdot \frac{c^n}{c^n + EC_{50}^n} \quad \text{1. egyenlet}$$

ahol: c – az agonista koncentrációja; E – az agonista hatása c koncentrációnál; E_{max} – az adott agonistával az adott rendszerben elérhető maximális hatás; EC₅₀ – a félhatásos koncentráció; n – a E/c görbe meredekségét az EC₅₀-nél jellemző tényező (Hill koefficiens).

Az individuális E/c görbék Hill paramétereit (E_{max}, EC₅₀, n) az statisztikai analízishez használtuk. Némely átlagolt E/c görbe Hill paramétereit más görbék matematikai korrekciójához használtunk fel.

2.7. Az NBTI és a DCF torzító hatásának kvantifikálása

Az ADA és a nukleozid transzport blokád gátlásának hatására fölszaporodó többlet interstitialis adenzin torzította (deprimálta) az NBTI, illetve DCF jelenlétében felvett E/c görbéket. A torzítás az E/c görbe koncentráció és hatás értékeire is befolyással van, mivel a torzított hatás értékek az exogén adagolt adenzinnal vannak felvéve, figyelmen kívül hagyva így a (kezelés hatására felszaporodó) többlet endogén adenzint. Mivel a DCF-ről korábbi vizsgálataink során kiderült, hogy befolyásolja a pitvari A₁ receptorok jelátviteli

hatékonyságát, a torzult E/c görbék, amelyeket CPA-val (A_1 receptor agonista) vettünk fel DCF jelenlétében, ki lettek zárva a vizsgálatból. A CPA-val vagy MC-al felvett E/c görbék torzítása az RRM segítségével kvantifikálható az alábbi egyenlet használatával:

$$E' = 100 - \frac{100 \cdot \left(100 - E_{\max} \cdot \frac{(c_x + c)^n}{(c_x + c)^n + EC_{50}^n} \right)}{100 - E_{\max} \cdot \frac{c_x^n}{c_x^n + EC_{50}^n}} \quad 2. \text{ egyenlet}$$

Ahol: E' 1. vizsgálat esetén – a CPA görbéinek átlagolt hatása NBTI jelenlétében (S3-NBTI vagy T3-NBTI csoportok, amelyek torzulnak tekintettek); E' 2. vizsgálat esetén – az S3-NBTI, T3-NBTI, S DCF és T DCF csoportok (torzult) MC E/c görbéinek átlagolt hatás értéke; E_{\max} , EC_{50} , n 1. vizsgálat esetén – az S3-kontrol vagy T3-kontrol csoport átlagolt CPA E/c görbéjének empirikus paraméterei; E_{\max} , EC_{50} , n 2. vizsgálat esetén – a megfelelő kontroll csoport (S DMSO, T DMSO, S Co, T Co) átlagolt MC E/C görbéjének Hill paraméterei; c 1. vizsgálat esetén – a E/c görbe szerkesztése során beadott CPA koncentrációja; c 2. vizsgálat esetén – a E/c görbe felvételéhez használt MC koncentrációja; c_x 1. vizsgálat esetén – a 2. egyenlet egyetlen variábilis paramétere, amely az a teoretikus CPA koncentráció, amely azonos hatást vált ki, mint az NBTI hatására extracellulárisan felhalmozódó endogén adenzin c_x 2. vizsgálat esetén – a 2. egyenlet variábilis paramétere az a MC koncentráció, ami ekvifektív a DCF vagy NBTI által felhalmozott többlet interstitialis adenzinnal.

2.8. Az NBTI és a DCF által torzított hatás értékek korrekciója

A korrekciót egy korábban leírt módszer alapján végeztük. Először a c_x értékekből kiszámoltuk a hozzájuk tartozó hatást (E_x) a Hill egyenlet segítségével:

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

Ahol: 1. vizsgálat esetén: E_x – az NBTI által felhalmozott többlet interstitialis adenzin által kiváltott hatás; c_x – a 2. egyenlet által nyújtott MC koncentráció; E_{max} , EC_{50} , n – a megfelelő kontroll CPA E/c görbe Hill paraméterei;

2. vizsgálat esetén: E_x – NBTI vagy DCF által felhalmozott többlet interstitialis adenzin által kiváltott hatás; c_x – a 2. egyenlet által szolgáltatott MC koncentráció (S NBTI, T NBTI, S DCF or T DCF csoportokhoz tartozó átlagolt MC E/c görbék); E_{max} , EC_{50} , n – a megfelelő kontroll MC E/c görbe Hill paraméterei.

Amikor az átlagolt S2-NBTI vagy T2-NBTI görbékből kiszámoltuk az E_x értékét, akkor, az átlagolt CPA E/c görbék (S3-kontrol és T3 kontrol csoportok) paramétereit behelyettesítettük a 3-as egyenletbe. Amikor, az E_x értékét az átlagolt S2-FSCPX+NBTI vagy T2-FSCPX+NBTI esetre számoltuk, akkor az S4-FSCPX vagy T4-FSCPX csoportok átlagolt empirikus paramétereit illesztettük be a 3-as egyenletbe.

Ezután a torzult hatásokból (E') és a hozzájuk tartozó E_x -ből kiszámoltuk a korrigált hatásokat az alábbi egyenlet használatával:

$$E = 100 - \frac{(100 - E') \cdot (100 - E_x)}{100} \quad 4. \text{ egyenlet}$$

Ahol: 1. vizsgálat esetén: E – a korrigált hatás (az átlagolt S2-NBTI, T2-NBTI, S2-FSCPX+NBTI vagy T2-FSCPX+NBTI görbék esetén); E' – a torzult hatás; E_x – az NBTI által létrehozott többlet interstitialis adenzin hatása („torzító” hatás)

2. vizsgálat esetén: E – a korrigált hatás; E' – a torzult hatás; E_x – az NBTI vagy DCF által létrehozott többlet interstitialis adenzin hatása (S NBTI, T NBTI, S DCF és T DCF csoportokhoz tartozó átlagolt MC E/c görbe).

Az S NBTI, T NBTI, S DCF és T DCF csoportok MC E/c görbék hatásértékeinek korrigálása érdekében e csoportok átlagolt torz hatásait (E') és a hozzájuk tartozó E_x értékeket a 4-es egyenletbe illesztettük. Az S DCF (CPA) és T DCF (CPA) E/c görbék korrekciója érdekében, a E/c görbék átlagolt, torz hatásértékeit illesztettük a 4-es egyenletbe az S DCF és T DCF Mc E/c görbék átlagolt E_x értékeivel. Ennek oka az, hogy a DCF indukálta interstitialis adenzin többlet független az utána következő E/c görbe felvételéhez használt agonista természetétől. Minden korrigált hatásértéket az in vitro adagolt MC és CPA koncentrációkkal szemben ábrázoltunk az adott E/c görbe esetén.

2.9. Az adatok elemzése

Minden egyes pitvar 3 kritériumnak kellett megfeleljen ahhoz, hogy megfeleljen a statisztikai elemzés által állított kritériumoknak: 1) A kiindulási kontrakciós erőnek el kellett érnie az 1 mN-t az első E/c görbe felvétele előtt; 2) pitvar mechanikai aktivitásának szabályossága; 3) A 10 μ M (oldószer-kezelt pitvarok) illetve 100 μ M (T₄-kezelt pitvarok) adonozinra adott válasznak a számtani közép \pm 2 SD tartományban kellett lenni.

Az átlagot és SD-t az első két kritériumnak megfelelő a pitvarok válasza alapján számoltuk ki (elválasztva az oldószer és a T₄ kezelt pitvarokat). Minden pitvart, amelyik megfelelt mindhárom kritériumnak, bevettünk a vizsgálatba.

A görbeillesztés során, Motulsky és Christopoulos (2004) ajánlását követve, az egyenletekben a koncentráció jellegű mennyiségek (c, EC₅₀ és c_x) logaritmusát szerepeltettük. A csoportok középértékeinek (vagy mediánjainak) különbségét p<0.05 esetén tekintettük szignifikánsnak. A görbeillesztéshez és a statisztikai elemzéshez a GraphPad Prism 6.05 szoftverét használtuk, míg a többi számítást Microsoft Office Excel 2013-al végeztük.

1. vizsgálat esetén: Két adatsort páros vagy párosítatlan t-teszt segítségével hasonlítottunk össze (ha a varianciák nem voltak homogének, akkor Welch-korrekciót alkalmaztunk). Több mint két adatsor összehasonlítására egyutas ANOVA-t vagy ismételt mérések egyutas ANOVA-t használtunk (Geisser-Greenhouse korrekcióval), amelyet Tukey post-teszt követett (mivel minden csoport adatai normális eloszlást követtek).

1. vizsgálat esetén: Az egyedi adonozin E/c görbék *in vivo* kezelés szerint összevont Hill paramétereit (oldószer-kezelt vs. T₄-kezelt pitvarok) és a kiválasztott E/c görbe párok nyers adatait párosítatlan Student-féle t teszttel vagy Welch-féle t teszttel (ha a varianciák szignifikánsan különböztek), vagy Mann-Whitney U teszttel (ha az adatok nem bizonyultak normális eloszlásúnak) hasonlítottuk össze. A különböző csoportok adonozin E/c görbéinek Hill paramétereit (külön az oldószeres és a T₄ kezelt csoportokra) egyutas ANOVA-val és Tukey poszt-teszttel vagy Kruskal-Wallis tesztet követő Dunn poszt-teszttel (ha a normalitás vizsgálaton nem feleltek meg) hasonlítottuk össze. Az MC E/c görbék Hill paramétereit kétutas ANOVA-val és Sidak poszt-teszttel vetettük össze (mivel minden csoport adatai normális eloszlást követtek).

3. Eredmények

3.1. Az 1. vizsgálat eredményei

3.1.1. Az 1-es és 2-es protokollok korrekció előtti adenzin E/c görbéi

Az oldószer kezelt pitvarok esetén, a korábbi vizsgálati eredményeinknek megfelelően, az FSCX (szelektív és irreverzibilis A_1 , receptor antagonist) előkezelés szignifikánsan jobbra tolta el a E/c görbéket, míg az NBTI (szelektív nukleozid transzport gátló) kezelés szignifikánsan balra tolta el, az adenzin E/c görbéket és szignifikánsan csökkentette az E_{max} -ot a kontrol görbékkel összehasonlítva. A T_4 kezelt pitvarok hasonlóan reagáltak FSCPX és NBTI előkezelésre, habár az NBTI által okozott E_{max} csökkenés nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét.

Az NBTI jelenlétében felvett, megfelelő görbéket összehasonlítva elmondhatjuk, hogy az FSCPX kezelés NBTI jelenlétében paradox módon növeli az E_{max} -ot (anélkül, hogy más empirikus paramétereket befolyásolna) az oldószer és a T_4 kezelt pitvarok esetén egyaránt. Következésképp az FSCPX+NBTI görbék E_{max} értékei az adott kontrol görbék és az NBTI görbék E_{max} értékei között helyezkednek el, de a különbség csak az oldószer kezelt pitvarok esetén szignifikáns.

3.1.2. CPA E/c görbék

A CPA az adenzinhez hasonlóan koncentrációfüggően csökkentette a pitvari kontrakciós erőt. Az oldószer kezelt pitvarok esetén, a korábbi vizsgálatainkkal megegyezően, az NBTI csökkentette az E_{max} -ot (és a Hill koefficiens is), valamint növelte a $\log EC_{50}$ -et is, míg az FSCPX csak a $\log EC_{50}$ értékét növelte, így sokkal inkább kompetitív antagonisták hatását, mintsem irreverzibilis A_1 receptor antagonisták hatását utánozva. A T_4 kezelt pitvarok esetén az oldószer kezelt pitvarokhoz hasonló eredményeket kaptunk. A két legjelentősebb különbség az, hogy az NBTI-nek sokkal kifejezettebb a depresszív hatása, valamint az FSCPX kisebb fokú jobbra történő eltolódást okozott a hyperthyreoid CPA E/c görbék esetén, a megfelelő kontrol görbékhez viszonyítva.

3.1.3. Az 1-es és 2-es protokollok korigált E/c görbéi

Mivel az interstitialis adenzin szint ismeretlen az A₁ receptorok mikrokoznyezetében, csak az NBTI és FSCPX+NBTI görbék hatás értékei korigálhatók, ami az adenzin és CPA negatív inotrópiát illető egyenértékűségén alapul. Így, jobb lehetőség híján, a korigált hatás értékeket az exogén adagolt, kádban lévő adenzin koncentrációjával szemben ábrázoltuk. Erre a célra, a transzformált E/c görbék a legalkalmasabbak, melyek a legnagyobb koncentráció értékekhez tartozó korigált hatásokat mutatják (mivel a transzformált E/c görbék szaturációja után, az NBTI okozta többlet adenzin koncentráció már irrelevánssá válik). A korigált maximális hatások egyedülállóan reprezentálják az adenzin által (általunk alkalmazott speciális körülmények között) tengerimalac pitvaron elérhető negatív inotróp hatásokat. Ez két ok miatt lehetséges. Egyrészt az NBTI lehetővé teszi az adenzin E/c görbék teljes szaturációját, mivel csökkenti az adenzin sejt belseje felé irányuló transzportját, ami az adenzin legfőbb eliminációs útvonala. Másrészt a RRM nyújtotta korrekció kizárja az NBTI okozta endogén adenzin akkumuláció torzító hatását.

Jelentéktelen különbségeket találtunk az S2-kontrol és S2-NBTI görbék átlagolt maximális hatás értékei között. Elmondhatjuk, hogy az NBTI nem képes fokozni az adenzin indukált direkt negatív inotróp hatást euthyreoid pitvarokon. Szemben a T2-NBTI korigált maximális hatás értékével, melyek jelentősen meghaladták a T2-kontrol görbét. Ez a tény azt mutatja, hogy az NBTI szignifikánsan növeli az adenzin direkt negatív inotróp hatását hyperthyreoid pitvarokon.

Az euthyreoid (S2-NBTI és S2-FSCPX + NBTI) állapotot reprezentáló korigált görbék fő jellemzői megegyeztek korábbi vizsgálatainkkal: azok egymással helyet cseréltek, az eredeti görbékkel összehasonlítva és a görbék végső részei meglehetősen közel kerültek egymáshoz, ami azt mutatja, hogy az adenzin által, A₁ receptoron kiváltott direkt negatív inotróp hatásra vonatkozó receptor rezerv meglehetősen nagy. E tulajdonságot a korigált hyperthyreoid görbékre alkalmazva (T2-NBTI és T2-FSCPX+NBTI) azt találjuk, hogy a T₄ kezelés nem befolyásolja a fent említett A₁ receptor rezervet. Azonban míg a korigált S2-FSCPX+NBTI görbe (kicsivel) az S2-kontrol görbe alatt fut a két legmagasabb adenzin koncentráció esetén, a legutolsó részén a korigált T2-FSCPX+NBTI görbe jelentősen a T2-kontrol görbe fölött fut (hasonlóan a korigált T2-NBTI görbéhez).

3.2. A 2. vizsgálat eredményei

3.2.1. MC E/c görbék

MC válasz: A MC is koncentrációfüggően csökkentette a pitvari kontrakciós erőt (direkt negatív inotróp hatás).

A CPX és a DMSO hatása a MC válaszra: A megfelelő kontrol csoportok (Co, CPX, DMSO), amelyek ugyanazt az in vitro kezelést kapták, nem különböztek szignifikánsan egymástól, sem a különböző MC koncentrációkra adott válaszbán, sem pedig a MC E/C görbe Hill paraméteriben. Ez a megfigyelés alátámasztja, hogy a DMSO, a CPX, az NBTI és a CPX vivőanyaga nem befolyásolja számottevően az MC-re adott választ.

A T₄ hatása az MC válaszra: A T Co és T DMSO csoportot összehasonlítva az oldószer kezelt párjával, látható, hogy a T₄ mérsékelten elnyomta az MC választ, ami magasabb MC koncentrációnál volt szignifikáns. Ezzel összhangban a T₄ kezelés hatására csökkent az E_{max} (szignifikáns) és az n (a statisztikai szignifikancia határán), miközben nőtt a log EC₅₀ értéke (de nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét).

Az MC válaszára NBTI által kifejtett hatás: Az NBTI az oldószer és a T₄ kezelt csoportokban is szignifikánsan csökkentett az MC-re adott választ, a hagyományos (azaz még torz) E/c ábrázolásmód mellett. Ez, az E_{max} szignifikáns csökkenésében, valamint a kisfokú log EC₅₀ növelésében manifesztálódott. Az NBTI e hatása sokkal intenzívebb a T-NBTI csoport esetében, mint az S-NBTI csoport esetén.

Az NBTI interstitialis adenzinra kifejtett hatása: Az NBTI jelenlétében, hagyományosan illesztett MC E/c görbék depressziójára alapozva a többlet interstitialis adenzin 101,2 nM (oldószerkezelt) és 151,1 nM (T₄ kezelt) MC-vel volt ekvielektív hatású. Ez azt jelenti, hogy a nukleozid transzport blokádi sokkal nagyobb adenzin felhalmozódást produkál, a T₄ kezelt pitvarokban, mint az oldószerkezelt társaikban, hasonlóan egy korábbi tanulmányhoz, amelyben CPA-val vettünk fel E/c görbéket.

A DCF hatása az MC válaszra: Hagyományos E/c görbe ábrázolás mellett a DCF csökkentette a MC-ra adott választ mind az oldószerrel, mind pedig a T₄-nal kezelt pitvarok esetén. Ez a torzítás euthyreoid körülmények között inkább szimbolikusnak, míg hyperthyreoid körülmények között jól kifejezettnek mondható. A CPX ugyanakkor kivédte a DCF hatását az MC E/c görbéken, mindkét thyreoid állapotban. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a DCF MC válaszra gyakorolt hatása az interstitialis adenzin

szint emelésén keresztül valósul meg, csakúgy, mint ahogy azt az NBTI esetén tapasztaltuk. Megjegyzendő, hogy a DCF hatása a MC válaszra csak a T₄-kezelt pitvarokon volt szignifikáns (kivéve a 10 nM MC-ra adott választ a S DCF csoportban, de az irrelevánsnak látszik). Ennek megfelelően az E_{max} csökkenése csak a T DCF csoportban volt szignifikáns.

A DCF hatása az interstitialis adenzin szintre: A 2. egyenletet az S DCF és a T DCF csoportok MC E/c adataira illesztve, a többlet interstitialis adenzin 28,05 nM (oldószer-kezelt pitvarok) illetve 44,36 nM (T₄-kezelt pitvarok) MC-nal bizonyult ekviekvívnek. Ezek az eredmények nagyon hasonlóak az NBTI alkalmazása során tapasztaltakkal, a DCF tehát, úgy tűnik, nagyobb interstitialis adenzin-szint emelkedést hoz létre a T₄-kezelt pitvarokon, mint az oldószer-kezeltéken. Azonban a DCF kisebb mértékű interstitialis adenzin szint növekedést okozott, mint az NBTI, mindkét thyreoid állapotban.

3.2.2. CPA E/c görbék

CPA válasz: A CPA szintén koncentráció függő mértékben csökkentette a kontrakciós erőt (direkt negatív inotróp hatás).

T₄ hatása a CPA válaszra: Összehasonlítva a T CO (CPA) és S Co (CPA) csoportokat elmondhatjuk, hogy a T₄ kezelés jelentősen csökkentette a CPA választ, amely a közepes és magas koncentrációk esetén szignifikáns eltérés volt. A T₄ kezelés szignifikánsan csökkentette az E_{max} az n és növelte a log EC₅₀ értékeket. Így a T₄ kezelés nagyobb csökkenést okoz a CPA E/c görbén, mint az MC görbén.

A DCF hatása az CPA válaszra: Szemben a MC esetén tapasztaltakkal, a DCF serkenti a CPA választ mind az oldószer, mind a T₄ kezelt pitvarok esetén, a hagyományosan illesztet (torz) E/c görbék esetén. Míg a DCF e hatása kismértékű az oldószer kezelt pitvarok esetén, addig szignifikáns a T₄ kezelt pitvarok esetén kis és közepes koncentrációtartományokban. Ezzel egyetértésben, a DCF szignifikánsan csökkentette a log EC₅₀ értéket a T₄ kezelt pitvarok esetén, míg az oldószerkezeltnél nem. Korábbi vizsgálatainkkal megegyezően az ADA gátlása fokozza az A₁ receptorok által mediált negatív inotróp hatás hatékonyságát hyperthyreoid pitvarok esetén.

3.2.3. Korrigált MC és CPA E/c görbék

A korrigált E/c görbéknek két érdekes pontja van, a kezdő és a végső pontok. A kezdőpont az E_x értéket (c_x -hez tartozó hatást) mutatja, míg a végpont a kérdéses agonista, adott rendszerbeli maximális válaszát mutatja. Mivel a c_x értékkel már foglalkoztunk korábban, itt a hangsúly a korrigált E/c görbe végpontján van, pontosabban annak, megfelelő kontrol E/c görbéhez viszonyított helyzetén van.

NBTI MC-vel: A korrigált Mc E/c görbék (amelyek NBTI előkezelést kaptak) vége némileg a kontrol görbék alatt volt. Így, ha hibának tekintjük a kontroll és korrigált E/c görbék maximális hatásában megfigyelt minimális különbséget, akkor elmondható, hogy az NBTI nem befolyásolja az M_2 muszkarinerg rendszer jelátviteli hatékonyságát, függetlenül a thyreoid állapottól.

DCF MC-vel: A korrigált MC E/c görbék (amelyek DCF előkezelést kaptak) ugyanazt a maximumot érik el (a legmagasabb koncentrációknál), mint a kontroll görbék. A levonható következtetés ugyanaz, mint az NBTI esetén, azaz a DCF nem befolyásolta a pitvari M_2 muszkarinerg rendszer jelátviteli hatékonyságát, függetlenül a T_4 kezeléstől.

DCF CPA-val: A korrigált CPA E/c görbék (amelyek DCF előkezelést kaptak) minden koncentráció (még a legmagasabb esetén is) esetén kiváltották a kontroll görbének megfelelő hatást. Ez azt jelenti, hogy a DCF fokozza A_1 adenzinerg rendszer direkt negatív inotrópiára vonatkozó hatását tengerimalac pitvar esetén. Ez a jelenség sokkal kifejezettebb a T_4 kezelt pitvarok esetén, egyetértésben korábbi eredményeinkkel. Azonban, a jelenlegi vizsgálat azt is mutatja, hogy a DCF euthyreoid állapotban is képes hatékonyságnövelő hatásának kifejtésére.

4. Megbeszélés

4.1. Az 1. vizsgálat eredményeinek értelmezése

Legjobb tudásunk szerint a 1. vizsgálat az **első**, ami bizonyítja, hogy a T₄ kezelés nem befolyásolja számottevően az adozin kiváltotta direkt negatív inotrópiára vonatkozó A₁ receptor rezervet tengerimalac pitvaron. **Másodsorban** kutatásaink bizonyítják, hogy az intracelluláris adozin eliminációjának NBTI-vel történő csökkentése számottevően növeli az adozinra adott maximális választ hyperthyreoid pitvaron (míg euthyreoid esetén nem).

Két korábbi vizsgálat során számottevő A₁ receptor rezervet találtunk mind a stabil szintetikus agonistákra, mind pedig a bomlékony, fiziológiás adozinra adott negatív inotrópiára vonatkozóan. Az eredmények arra engednek következtetni, hogy azok a szerek, melyek A₁ receptor aktivációt okoznak (még ha kis hatékonysággal is) talán szignifikánsan csökkenthetik a pitvar mechanikai aktivitását.

A hyperthyreosis egy olyan patológiás állapot, amely számtalan elemét befolyásolhatja az A₁ adozinerg jelátvitelnek. Következésképp a thyreoid hormonok csökkentik az A₁ receptorok pitvari kontrakciós erőre kifejtett hatását, habár ennek mechanizmusa még nem teljesen tisztázott. Így, elvárható lenne, hogy a thyreoid hormonok csökkentik a pitvari kontrakciós erőhöz tartozó, negatív inotróp hatást illető, A₁ receptor rezervet. Jelen tanulmány célja ennek a lehetőségnek a tesztelése volt.

A kutatás feltárta, hogy a T₄ kezelés nem befolyásolja lényegesen a negatív inotrópiát illető A₁ receptor rezervet, habár szignifikánsan csökkenti az adozin és CPA direkt negatív inotróp hatását. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy bármilyen indikációban használt, A₁ receptort stimuláló szer egy kisebb fokú, pitvari kontrakciós erő csökkenésben jelentkező rizikót jelent eu- és hyperthyreoid állapotban egyaránt. Így, amikor egy szisztémás A₁ receptor agonistát növekvő koncentrációban alkalmazunk ez a nem kívánt hatás, egy lehetséges kardiális mellékhatásként jelentkezhet mindkét thyreoid állapot esetén. A kutatás legfontosabb eredménye, hogy az alkalmazott A₁ receptor agonista koncentráció kisebb mértékben csökkenti a kontrakciós erőt hyperthyreoid állapotban, mint euthyreoid állapotban.

A kutatás jelentősége az, hogy a pitvari kontrakció gyengülése romló

pumpafunkcióhoz és ezáltal renyhe kamrai töltődéshez vezet. Ráadásul a csökkent pitvari pumpafunkció növeli a pitvari thrombus kialakulásának lehetőségét. Ezen okok miatt fontos figyelembe venni, hogy A_1 stimulációt okozó szerek kifejthetik, pitvari kontrakciós erőt csökkentő hatásukat, még hyperthyreoid körülmények között is.

Az NBTI jelenlétében felvett, korrigált adenzin E/c görbék esetén, a nukleozid transzport blokádnak sokkal nagyobb maximális hatás növekedést okozott adenzinra adott pitvari válaszból hyperthyreoid körülmények között, mint euthyreoid állapotban. Így, habár az adenzin által kiváltott negatív inotróp hatás szupresszált hyperthyreoid állapotban, mégis sokkal nagyobb a lehetősége annak hyperthyreosisban, mint euthyreosisban. Ez megerősíti azokat a korábbi megfigyeléseket, hogy a nukleozid transzport kapacitás emelkedett volt hyperthyreoid patkány pitvarok esetén, valamint a befelé irányuló adenzin transzport kapacitás fokozottabb volt hyperthyreoid tengerimalac pitvar esetén euthyreoid kontrollal összehasonlítva. A megnövekedett befelé irányuló adenzin transzport valószínűleg részt vesz a szupresszált adenzin válasz kialakításában hyperthyreoid körülmények között, mivel gyorsabban távolítja el az adenzint az interstitialis térből és ezáltal az A_1 receptorok mikro környezetéből.

A 1. vizsgálat hiányossága, hogy következtetéseinket tengerimalac kísérletekből vontuk le. A humán szívre való extrapoláció az ember és tengerimalac pitvari A_1 receptorok és jelátviteli útvonalak hasonlóságán alapul.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy bár az A_1 receptor mediálta direkt negatív inotróp hatás szupresszált állapotban van hyperthyreosisban, az ehhez a hatáshoz tartozó receptor rezerv nem tér el lényegesen a két thyreoid állapotban. Ez arra utal, hogy ha (bármilyen indikációban) egy A_1 receptor agonistát alkalmazunk, még ha egy parciális agonistát is, a pitvari kontrakciós erő valószínűleg gyengülni fog mind eu-, mind hyperthyreoid állapotban. Lehetséges (bár nem szükségszerű), hogy ez a mellékhatás már az A_1 receptor agonista (vagy „enhanszer”) azon koncentrációjánál jelentkezik, amely szükséges az eredeti indikáció szerinti kívánt hatás kifejtéséhez. Emellett kimutattuk, hogy tengerimalac pitvaron a nukleozid transzport blokádnak jelentősen növeli az adenzin által kiváltott direkt negatív hatás maximumát hyperthyreoid körülmények között (ezzel szemben euthyreoid állapotban nem).

4.2. A 2. vizsgálat eredményeinek értelmezése

A 2. vizsgálat eredményeiből leszűrhető **első** következtetésünk, hogy az ADA gátlás növeli az A₁ adenzin receptor negatív inotrópiát illető jelátviteli hatékonyságát (míg a nukleozid transzport blokád nem). Ebből arra következtethetünk, hogy az ADA gátlás hatással van a pitvari A₁ adenzinerg rendszer azon részére, amely nem közös az M₂ muszkarinerg jelátvitel útvonalával. **Második** következtetésünk, hogy az ADA gátlás ezen hatása hyperthyreosisban még erősebb. Ez azt jelenti, hogy az ADA gátlás képes – legalábbis részben – visszaállítani a thyreoid hormonok által elnyomott A₁ receptor mediálta direkt negatív inotróp hatást. **Harmadik** következtetésünk, hogy az ADA gátlás kisebb interstitialis adenzin koncentráció emelkedést okoz, mint a nukleozid transzport gátlása. A **negyedik** megállapításunk, hogy a T₄ kezelés tengerimalac modellben is csökkenti az M₂ muszkarin receptor mediálta direkt negatív inotróp hatást (bár az M₂ muszkarinerg funkció csökkenése meglehetősen kicsi az A₁ adenzinerg funkciócsökkenéséhez képest thyreoid hormonok hatására).

Egy korábbi vizsgálatunkban azt találtuk, hogy a DCF segítségével létrehozott ADA gátlás fokozta a szelektív A₁ receptor agonista CPA direkt negatív inotróp hatását hyperthyreoid tengerimalac pitvaron. Mivel a CPA nem szubsztrátja az ADA-nak, feltételezzük, hogy az ADA gátlás növeli a pitvari A₁ receptor és/vagy a posztreceptorális struktúrák jelerősítő képességét hyperthyreoid állapotban. Feltételeztük továbbá, hogy az ADA gátlás hatékonyságnövelő hatása sokkal inkább az intracelluláris adenzin felhalmozódással lehet összefüggésben, mintsem az interstitialissal (noha ez utóbbi felelős az sejtfelszíni A₁ receptorok stimulációjáért, ami az ADA gátlás legtöbb előnyös hatásának előzménye). Ezt a feltételezést támasztja alá az is, hogy a fiziológiásan a cardiomyocyták belseje felé irányuló nukleozid transzport gátlása, ami növeli az interstitialis adenzin koncentrációt és csökkenti az intracellulárisat, nem növeli az A₁ adenzinerg rendszer hatékonyságát sem eu-, sem hyperthyreoid állapotban.

A legnagyobb akadály a jelenség tisztázása során az volt, hogy az ADA gátlás az A₁ receptor funkció hatékonyságának növelése mellett emeli a szöveti adenzin szintjét. A többlet adenzin A₁ receptor aktivációhoz vezet, ami A₁ receptoron mediálódó hatásban jelentkezik. Vizsgálatunk során a kontrakciós erő gyengülése (amit az ADA gátlás miatt felhalmozódott többlet adenzin okozott) interferált az ADA gátlás hatékonyságnövelő hatásával az A₁ receptoron mediálódó direkt negatív inotrópiát illetően. Így az ADA gátlás két hatása szétválaszthatatlanul összefonódott a korábbi vizsgálati elrendezésben.

A jelen vizsgálatban célunk az ADA gátlás két hatásának szétválasztása volt. Ennek érdekében megismételtük előző kísérleteinket úgy, hogy CPA helyett MC-t (nagy M_2 affinitású muszkarin receptor agonista) használtunk.

A jelen vizsgálat kulcskonceptiója a következő: Ha az A_1 receptort és az ADA-t egyidejűleg gátoljuk, az ADA gátlás következtében felhalmozódó többlet adenzin direkt negatív hatása kivédhető, azonban a direkt negatív inotróp hatás jelátviteli útvonalai az M_2 receptorok felől elérhetőek maradtak. Ha tehát az ADA gátlás (hatékonyságfokozásért felelős) molekuláris célpontja az A_1 és M_2 receptorok közös jelátviteli útvonalai egyikén van, fokozott MC válaszra számíthatunk. Ha ez az eset állna fent, akkor sikerült az ADA gátlás hatékonyságnövelő hatása mögött álló lehetséges mechanizmusok körét szűkíteni. Ha nem, akkor a lehetséges hatásmechanizmusok körének szűkítésén túl (ugyanis akkor a kérdéses molekuláris célpont kívül esik az A_1 és M_2 receptorok jelátvitelének közös részén) lehetőségünk adódik az ADA gátlás okozta interstitialis adenzin többlet kvantifikálására. Ez azért válna ekkor lehetségessé, mert a kvantifikáció előfeltétele az M_2 muszkarinerg rendszer jelerősítő tulajdonságainak állandósága a vizsgálat alatt.

Vizsgálataink azt mutatják, hogy a CPX jelenlétében, DCF által gátolt ADA nem befolyásolta az MC választ. Így megállapíthatjuk, hogy az ADA gátlás nem az A_1 és M_2 receptorok közös jelátviteli útvonalaira fejt ki hatását. Ezért kvantifikálni tudjuk az ADA gátlás, interstitialis adenzin koncentrációjára kifejtett hatását és aztán össze tudjuk hasonlítani a hasonló hatású (NBTI) nukleozid transzport blokáddal.

A nukleozid transzport gátlás, valamint az ADA gátlás (A_1 receptor blokad nélkül) kismértékű MC válasz csökkenést mutatott az alapállapothoz képest. Ez a jelenség annak köszönhető, hogy a többlet interstitialis adenzin, az A_1 rendszer aktiválása által torzítja az M_2 receptor által mediált hatást. Az átfedő jelátviteli útvonalak miatt ugyanis az A_1 adenzinerg rendszer válaszkapacitásának egy része el lesz használva, ezáltal az M_2 muszkarinerg válaszkapacitása szintén csökken. Az E/C görbe változásának (torzítás) nagysága jellemző a torzító hatás nagyságára.

A torz MC E/c görbék interstitialis adenzin szintjének megbecsléséhez az RRM módszert használtuk. Az RRM jellegzetessége az azonos hatást kiváltó agonista cserélhetősége függetlenül attól, hogy milyen receptorhoz kötődnek. Esetünkben az RRM kvantifikálja az extra interstitialis adenzin koncentrációt egy hasonló paraméterrel, ez esetben az ekvifektív MC koncentrációval (c_x).

Jelen tanulmány c_x értékei azt mutatják, hogy az NBTI lényegesen emeli az interstitialis adenzin szintet és ez a hatás nagyobb volt hyperthyreoid tengerimalac

pitvaron, mint euthyreoid párján. Ezek az eredmények megerősítik az NBTI hatásáról szerzett korábbi tapasztalatainkat, amiben a c_x értékeket ekvиеffektív CPA koncentrációknak tekintettük.

Jelen tanulmány c_x értéke szintén azt jelzi, hogy a DCF, hasonlóan az NBTI-hez növeli az interstitialis adenzin szintet mind eu-, mind hyperthyreoid tengerimalac pitvar esetén. Mindezt számokkal kifejezve, az NBTI 3,5-szer nagyobb c_x értéket okozott, mint amire a DCF képes volt, függetlenül a thyreoid állapotra. Ez azt jelzi, hogy a nukleozid transzport blokádnak sokkal nagyobb hatása van az interstitialis adenzin szintre, mint az ADA gátlásnak (az általunk vizsgált, jól oxigenizált fürdő médiumban, ex vivo körülmények között). Azonban a nukleozid transzport gátlás csak metabolikusan intakt myocardiumon fejt ki interstitialis adenzin szint emelő hatását. Hypoxiás körülmények között a nukleozid transzport blokádnak képes csökkenteni az interstitialis adenzin szintet a sejtből történő adenzin felszabadulás gátlása által. Így az interstitialis adenzin szint emelésére az ADA gátlás egy sokkal megbízhatóbb beavatkozásnak tűnik, mint a nukleozid transzport blokádnak. Megjegyzendő, hogy az ADA gátlóknak test szerte számtalan hatás kiváltására alkalmasak, amely számos mellékhatás kialakításához vezethet. Azonban ezek a mellékhatások kevésbé problematikusak abban az esetben, ha csak egy adott szerven alkalmazzuk azokat és nem szisztémásan, mint például a szív transzplantáció. Az ADA gátlókról kiderült, hogy képesek csökkenteni a hypoxiás sérüléseket szívműtétek esetén.

Az ADA gátlás alatt, az M_2 muszkarinerg rendszer jelátviteli tulajdonságainak változatlansága miatt, a c_x értékek lehetőséget adtak arra, hogy a DCF és NBTI (CPX jelenléte nélkül) jelenlétében felvett MC E/c görbék hatás értékeit korigáljuk a többlet interstitialis adenzin torzító hatására. Mivel a többlet adenzin koncentrációja ismeretlen maradt a vizsgálat folyamán, a korigált hatás értékeket az E/c görbe felvételéhez használt agonista koncentrációjának függvényében tudtuk csak ábrázolni. Emiatt a korigált E/c görbe két legfontosabb pontja a nulla és a maximális koncentrációhoz tartozó hatás értékek. A kezdő koncentrációhoz tartozó pont mutatja a többlet interstitialis adenzin által, egyedül kiváltott hatást (Ex), a maximális koncentrációhoz tartozó pont pedig az adott rendszer maximális válaszát adja meg az adott agonistára.

A korigált MC E/c görbék legfontosabb jellemzője, hogy gyakorlatilag ugyanott végződnek, ahol a nekik megfelelő kontroll görbék. A görbék e tulajdonsága megerősíti, hogy az M_2 muszkarinerg rendszer jelátviteli hatékonysága a pitvari kontraktilitás viszonylatában, ADA gátló és nukleozid transzport gátló jelenlétében sem változik meg.

Ezzel szemben a korrigált CPA E/c görbék meghaladják a kontrol görbéiket a legmagasabb koncentrációnál, mely viselkedés különösen hyperthyreoid állapotban gyanús. Arra következtethetünk, hogy az ADA gátlás növeli az A₁ adenozinerg direkt negatív inotróp hatást már euthyreoid állapotban is. Mindazonáltal korábbi megfigyeléseinkkel egyetemben, az ADA gátlás hatékonyságnövelő hatása erősebb hyperthyreoid állapotban. Az NBTI DCF jelenlétében történő felhasználásával kapott vizsgálati eredmények összehasonlítása alapján az ADA gátlás hatékonyságnövelő hatása sokkal inkább az intracelluláris, mintsem az interstitialis adenzin szint emelkedése indukálja.

Vizsgálataink alapján az ADA gátlás helyrehozza a T₄ indukált, A₁ receptor mediált direkt negatív inotróp funkció szupresszióját, ami egy adenozinerg protektív (energia fogyasztást limitáló) hatás. Ennek jelentőségét az tény adja, hogy a többlet thyreoid hormonok egy extra terhet rónak a szívre, ezáltal növelve az ischaemiás szívbetegségek, a supraventricularis arrhythmiák és a pangásos szívelégtelenség kockázatát. Így a szív ADA gátlásával történő endogén protektív mechanizmusainak fokozása egy különösen ígéretes lehetőségnek tűnik hyperthyreosisban.

Összefoglalásképpen elmondhatjuk, hogy az ADA gátlás növeli az A₁ adenozinerg rendszer direkt negatív inotrópiát illető jelátviteli hatékonyságát eu- és hyperthyreoid tengerimalac pitvarok esetén. Ez az eredmény azt jelzi, hogy az ADA gátlás az interstitialis adenzin-szint emelése mellett egy másik mechanizmussal is növeli az A₁ adenozinerg direkt negatív inotrópiát. Eredményeink tehát az ADA gátlás egy új, thyreoid hormon szenzitív hatásmechanizmusát sugallják, amelynek jelentősége lehet a szív ischaemiával szembeni toleranciájának javításában.

5. Összefoglalás

A hyperthyreosis több mechanizmus révén növeli a kardiovaszkuláris mortalitást, ezért azon terápiás stratégiák, melyek képesek a szív ischaemiával szembeni toleranciáját növelni, különösen hasznosak lehetnek a hyperthyreoid betegek számára. Az egyik ilyen ígéretes lehetőség az A₁ adozin receptorok aktiválása (direkt vagy indirekt módon), mivel ez olyan protektív mechanizmusokat indukál, mint például az ischaemiás perkondicionálás. Az A₁ adozinerg rendszert stimuláló szerek lehetnek A₁ receptor agonisták, A₁ receptor érzékenyítők, vagy az adozin szintjét növelő szerek, mint például az adozin lebontását végző egyik enzim, az adozin-dezamináz (ADA) gátlói.

Az A₁ receptor agonisták azonban, még ha csak parciális agonisták is, magukban hordozzák a mellékhatások kockázatát. Korábbi ex vivo vizsgálataink során nagy A₁ receptor rezervet találtunk az adozin által kiváltott direkt negatív inotróp hatást illetően izolált tengerimalac pitvar esetében. Ez a jelenség arra utal, hogy az A₁ receptort stimuláló ágensek csökkenthetik a pitvar mechanikai aktivitását in vivo is. A thyreoid hormonok moduláló hatása miatt, a hyperthyreosis hatással lehet az A₁ receptor agonisták lehetséges mellékhatásaira.

Első vizsgálatunk alapján azt mondhatjuk, hogy a tiroxin kezelés nem befolyásolja lényegesen az adozin pitvari direkt negatív inotróp hatására vonatkozó A₁ receptor rezervet. Következésképp, ha bármilyen indikációban is alkalmazunk valamilyen A₁ receptor aktivációt okozó szert, akkor számolnunk kell annak pitvari kontrakciós erő csökkentő hatásával, mint lehetséges mellékhatással, mind eu-, mind hyperthyreoid állapotban. Az érem másik oldala, hogy ez az eredményünk azzal biztat, hogy az A₁ adozinerg rendszerben rejlő kardioprotektív potenciál hyperthyreosisban is megtartott.

A második vizsgálatunk során azt találtuk, hogy az ADA gátlás (szemben a nukleozid transzport blokáddal) növeli az A₁ adozinerg rendszer jelátviteli hatékonyságát (viszont változatlanul hagyja az M₂ muszkarinerg rendszer jelerősítését). Az ADA gátlás ezen hatása mindkét thyreoid állapotban jelentkezik, de nagyobb hyperthyreosisban. Mindazonáltal az ADA gátlás kisebb interstitialis adozin koncentráció növekedést okoz, mint a nukleozid transzport blokáddal, mindkét thyreoid állapotban. Eredményeink azt mutatják, hogy az ADA gátlás (az interstitialis adozin szintjének emelése mellett) fokozza az A₁ adozinerg rendszer jelerősítését, ami az ADA gátlásnak egy teljesen új, thyreoid hormon szenzitív hatásmechanizmusára utal.

6. Köszönetnyilvánítás

Kutatócsoportom munkáját a Debreceni Egyetem segítette, továbbá a következő források: OTKA-K 104017, TÁMOP 4.2.4. A/2-11-1-2012-0001 (a Nemzeti Kiválóság Program, amely személyi támogatást biztosított Tósaki Árpádnak és Gesztelyi Rudolfnak) és TÁMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045 (amely személyi támogatást biztosított Varga Balázs, Juhász Béla és David Haines számára).



Nyilvántartási szám: DEENK/150/2015.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Pák Krisztián
Neptun kód: B9W7R6
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10037912

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Pák, K.**, Zsuga, J., Képes, Z., Erdei, T., Varga, B., Juhász, B., Szentmiklósi, J.A., Gesztelyi, R.:
The effect of adenosine deaminase inhibition on the A1 adenosinergic and M2 muscarinergic control of contractility in eu- and hyperthyroid guinea pig atria.
Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 388 (8), 853-868, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-015-1121-6>
IF:2.471 (2014)
2. **Pák, K.**, Papp, C., Galajda, Z., Szerafin, T., Varga, B., Juhász, B., Haines, D., Szentmiklósi, J.A., Tósaki, Á., Gesztelyi, R.: Approximation of A1 adenosine receptor reserve appertaining to the direct negative inotropic effect of adenosine in hyperthyroid guinea pig left atria.
Gen. Physiol. Biophys. 33 (2), 177-188, 2014.
DOI: http://dx.doi.org/10.4149/gpb_2013079
IF:1.173

További Közlemények

3. Tajti G., **Pák K.**, Képes Z., Erdei T., Fodor A., Mikáczó A., Zsuga J., Szilasi M., Gesztelyi R.:
Asthma bronchiale-val kezelt betegek inzulinérzékeny és inzulinrezisztens-csoportjainak összehasonlítása.
Med. Thorac. 68 (3), 193-199, 2015.
4. **Pák K.**, Kiss Z., Erdei T., Képes Z., Gesztelyi R.: Új lehetőség farmakológiai agonisták receptorközeli koncentrációjának becslésére: A receptoriális válaszkésztség módszer (RRM).
Acta Pharm. Hung. 84, 38-52, 2014.



5. Kiss, Z., **Pák, 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. 32 (3), 325-335, 2013.
DOI: http://dx.doi.org/10.4149/gpb_2013041
IF:0.875
6. Gesztelyi, R., Kiss, Z., Wachal, Z., Juhász, B., Bombicz, M., Csépanyi, E., **Pák, 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. 36 (3), 293-305, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12272-013-0056-z>
IF:1.751
7. Gesztelyi, R., Kiss, Z., Zsuga, J., **Pák, 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:0.852

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 7,122

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az érkekezés alapjául szolgáló közleményekre):
3,644**

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, 2015.07.30.

