

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A nukleozid transzport gátlás hatása  
az interstitialis adenzin koncentrációra  
az A<sub>1</sub> adenzin receptorok környezetében  
eu- illetve hyperthyreoid tengerimalac  
pitvaron**

Karsai Dénes

DEBRECENI EGYETEM  
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM  
GYÓGYSZERÉSZTUDOMÁNYI KAR  
GYÓGYSZERHATÁSTANI TANSZÉK  
DEBRECEN, 2007.

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A nukleozid transzport gátlás hatása  
az interstitialis adenzin koncentrációra  
az A<sub>1</sub> adenzin receptorok környezetében  
eu- illetve hyperthyreoid tengerimalac  
pitvaron**

Karsai Dénes

TÉMAVEZETŐ: Dr. Tósaki Árpád

KONZULENS: Dr. Gesztelyi Rudolf

PROGRAMVEZETŐ: Dr. Gergely Lajos

DEBRECENI EGYETEM  
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM  
GYÓGYSZERÉSZTUDOMÁNYI KAR  
GYÓGYSZERHATÁSTANI TANSZÉK  
DEBRECEN, 2007.

...

Tudni: az ész rövid, az akarat gyenge.

Hogy rá vagyok bízva a vak véletlenre.

És makacs reménységgel mégis, mégis hinni.

Hogy amit csinállok, az nem lehet semmi.

...

Teller Ede: Vers cím nélkül

# Tartalomjegyzék

<b>1. Rövidítések</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Bevezetés</b> .....	<b>2</b>
2.1. Az adenzin és az adenzin receptorok .....	2
2.2. Az adenzin keletkezése, eliminációja és transzportja .....	3
2.3. Az adenzin interstitialis koncentrációjának mérése .....	5
2.4. Koncentrációváltozás becslése a Langmuir-Hill egyenlettel.....	7
2.5. Koncentrációváltozás becslése koncentráció-hatás görbe regresszióanalízisével.....	8
2.6. Az adenzin jelátvitelére a szívben .....	10
2.7. A thyreoid hormonok hatása az adenzin jelátvitelére és metabolizmusára a szívben.....	12
<b>3. Célkitűzések</b> .....	<b>16</b>
<b>4. Anyagok és módszerek</b> .....	<b>17</b>
4.1. Oldatok.....	17
4.2. Szöveti preparátumok .....	17
4.3. Kísérleti protokollok.....	19
4.4. Adatfeldolgozás.....	22
<b>5. Eredmények</b> .....	<b>26</b>
5.1. A tiroxinkezelés hatása a tengerimalacokra .....	26
5.2. Az adenzinra adott inotrop válasz .....	26
5.3. A nukleozid transzport gátlás hatása a nyugalmi kontrakciós erőre.....	27
5.4. A nukleozid transzport gátlás hatása a CPA-ra adott inotrop válaszra.....	28
5.5. A nukleozid transzport gátlás hatása a myocardialis A <sub>1</sub> receptorok környezetének adenzin koncentrációjára .....	30
<b>6. Megbeszélés</b> .....	<b>34</b>
6.1. Új lehetőségek keresése az interstitialis adenzin koncentrációjának meghatározására .....	35
6.2. A nukleozid transzport gátlás okozta adenzin-szint növekedés az A <sub>1</sub> receptorok környezetében tengerimalac pitvaron .....	43
6.3. A hyperthyreoid állapot befolyása a nukleozid transzport gátlás okozta adenzin-szint növekedésre a pitvari A <sub>1</sub> receptorok környezetében .....	46

<b>7. Összefoglalás</b> .....	<b>50</b>
<b>8. Summary</b> .....	<b>51</b>
<b>9. Irodalom</b> .....	<b>52</b>
<b>10. Saját tudományos munkák</b> .....	<b>61</b>
<b>11. Tárgyszavak</b> .....	<b>64</b>
<b>12. Függelék</b> .....	<b>65</b>
12.1. Egymást követő agonista-dózisok hatásának megjelenése a receptorfunkcióban .....	65
12.2. A koncentráció-meghatározó egyenlet levezetése.....	66
12.3. Fick első törvényének alkalmazása a transzmembranális adenzin transzportra.....	70
<b>13. Köszönetnyilvánítás</b> .....	<b>72</b>

# 1. Rövidítések

AC = adenilcikláz

A<sub>1</sub> receptor = A<sub>1</sub> adenozin receptor

ADA = adenozin dezamináz

Ado = adenozin

[Ado]<sub>ISF</sub> = az interstitialis folyadék Ado koncentrációja

ADP = adenozin-5'-difoszfát

AMP = adenozin-5'-monofoszfát

ATP = adenozin-5'-trifoszfát

cAMP = 3',5'-ciklikus adenozin monofoszfát

cGMP = 3',5'-ciklikus guanozin monofoszfát

CPA = N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine

DP = dipiridamol (dipyridamole)

E/[A] = koncentráció-hatás

ENT1 = ekvibratív és nitrobenzylthioinosine-nal gátolható nukleozid transzporter

K<sub>Ach/Ado</sub> = muszkarin-aktivált K<sup>+</sup> csatorna

L<sub>Ca</sub> = L-típusú Ca<sup>2+</sup> csatorna

M = mól/l

NBTI = S-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine

NT = szarkolemmális nukleozid transzport

PDE = 3',5'-ciklikus nukleotid foszfodiészteráz

PLB = foszfolambán

RRM = receptorial responsiveness method

T<sub>3</sub> = L-3,5,3'-trijód-tironin

T<sub>4</sub> = L-tiroxin (L-3,5,3',5'-tetrajód-tironin)

S = a T<sub>4</sub> oldószere („szolvens”)

SD = standard deviáció

SEM = standard hiba (standard error of the mean)

SAH = S-(5'-adenozil)-L-homocisztein

SER = simafelszínű endoplazmatikus retikulum

SR = szarkoplazmatikus retikulum (izomsejtbeli SER)

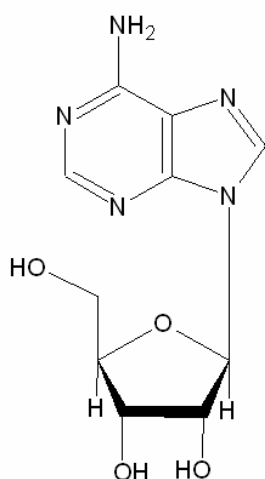
SERCA = SR Ca<sup>2+</sup>-ATP-áz (SR Ca<sup>2+</sup>-pumpa)

## 2. Bevezetés

A fejlett országokban a daganatos betegségek mellett a szív- és érrendszeri betegségek jelentik a legnagyobb kihívást a várható élettartam és az életminőség szempontjából. A szív ischaemiával szembeni védekezőképességének fokozása világszerte a kutatás élvonalában van. Ide tartozik a szívben az adenzin mediálta protektív folyamatok befolyásolása is.

### 2.1. Az adenzin és az adenzin receptorok

Az adenzin (Ado) adeninből és ribózból álló prekuzora és egyben



1. ábra. Adenzin

bomlásterméke az élő szervezet legfontosabb primer energiatároló molekulájának, az ATP-nek (1. ábra). Az Ado jelentőségét ezen túlmenően az adja, hogy az egész szervezetre kiterjedő szabályozó funkcióval rendelkezik a sejt- és szöveti szintű növekedésben, differenciálódásban és metabolizmusban. Akut excesszív keletkezése az ATP reszintézis zavarát jelenti, tehát az adott szövet sérülésének illetve kimerülésének jelzője. Ezzel összhangban az Ado részt vesz protektív és reparatív funkciók mediálásában is (összefoglalóként ld.: Fredholm és mtsai, 2001; Headrick és mtsai, 2003; Linden, 2005).

Az Ado hatásai döntően specifikus receptorok közvetítésével jönnek létre, melyeket régebben  $P_1$  purinerg receptoroknak hívtak (Burnstock, 1978).

Napjainkban, érvényesítve azt az elvet, hogy a receptorokat lehetőleg legnagyobb affinitású fiziológiás ligandjukról nevezzék el, Ado receptoroknak hívják őket (Fredholm és mtsai, 2001).

A Nemzetközi Farmakológiai Társaság (IUPHAR) jelenleg négy Ado receptor altípust tart nyilván, az  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  és  $A_3$  receptorokat, melyekhez szelektív agonisták és antagonisták állnak rendelkezésre (összefoglalóként ld.: Alexander és mtsai, 2001; Fredholm és mtsai, 2001). A szakirodalomban fellelhető

még egy ötödik altípus, az A<sub>4</sub> (Cornfield és mtsai, 1992), ám ezt eddig még nem sikerült klónozni (összefoglalóként ld.: Sommerschild és Kirkebøen, 2000; Hutchinson és Scammells, 2004).

## **2.2. Az adenzin keletkezése, eliminációja és transzportja**

Fiziológias körülmények között az Ado mind az extra-, mind az intracelluláris térben folyamatosan termelődik és eliminálódik.

Az extracelluláris keletkezésű Ado a sejtekből kijutott adenin nukleotidok (ATP, ADP, AMP, cAMP) katabolizálja, a folyamat sebesség-meghatározó lépése az ekto-nukleotidázok (főleg az ekto-5'-nukleotidáz (CD73) és az ekto-apiráz (CD39)) által katalizált AMP - Ado átalakulás.

Intracellulárisan az Ado zöme szintén AMP-ből keletkezik, főleg endo-5'-nukleotidáz, kisebb mennyiségben alkalikus foszfatázok révén. Az AMP energetikailag intakt körülmények között csak kisebb részben bomlik Ado-ra, nagyobb részét az AMP-dezamináz inozin-monofoszfáttá (IMP) alakítja, amely inozinná defoszforilálódik. Hypoxiában viszont az AMP bontása az Ado keletkezésének irányában tolódik el. Az Ado egy kisebb mennyiségét az S-adenozil-homocisztein-hidroláz (SAH-hidroláz) állítja elő S-adenozil-homociszteiből (SAH). A SAH-hidroláz által termelt Ado zöme az enzimhez kötött állapotban marad és intracelluláris Ado raktárat képez.

Az interstitialis Ado eliminációja három úton történhet: kimosódás a keringéssel, extracelluláris Ado dezamináz (ADA) általi bontás és membranális transzport az adott szövet sejtjeibe. A kimosódás nagy perfúziójú szövetben számottevő lehet, az extracelluláris ADA általi bontás viszont alárendelt jelentőségű, tengerimalac szívben például nem is kell vele számolni az ADA kizárólagos intracelluláris előfordulása miatt (Schutz és mtsai, 1981). A szívben az extracelluláris Ado-t elsősorban a vasculatura endotheliuma, másodsorban a cardiomyocyták veszik fel.

Intracellulárisan az Ado részben AMP-vé alakul az Ado kináz közreműködésével, részben az intracelluláris ADA inozinná dezaminálja. A szívben különösen aktív dezaminálás zajlik az endotheliumban. (A fentieket



részletesen ld.: Sommerschild és Kirkeboen, 2000; Deussen, 2000a; Fredholm és mtsai, 2001; Headrick és mtsai, 2003; Linden, 2005.)

A sejtek membránjában két típusú, ekvibratív (diffúziót facilitáló; ENT) és koncentratív (aktív transzportra képes; CNT) nukleozid transzporter fordulhat elő (összefoglalóként ld.: Thorn és Jarvis, 1996). A szívben döntően, a cardiomyocytákon (az általánosan elfogadott álláspont szerint) kizárólag ENT található, azon belül is ENT1, ami ekvibratív és nitrobenzylthioinosine (NBTI) szenzitív (Conant és Jarvis, 1994). Következésképp, noha a szív a rajta áthaladó vérből koncentráció-gradiens ellenében is képes Ado-t felvenni (Dekanski és mtsai, 2004), a cardiomyocytákon a nukleozid transzport (NT) irányát és intenzitását elsődlegesen a membrán két oldala közötti Ado koncentráció-gradiens szabja meg (Deussen és mtsai, 1999).

Összhangban azzal, hogy a sejtekben intenzívebb anyagcsere folyik, mint az interstitiumban, a bruttó intracelluláris Ado produkció mintegy tízszerese a bruttó interstitialisnak. Az erőteljes sejten belüli Ado újrahasznosításnak köszönhetően azonban a szívizomra nettó intracelluláris Ado elimináció és nettó interstitialis Ado termelés a jellemző. Ennek megfelelően a transzmembranális NT a sejt belseje felé irányul (Deussen és mtsai, 1999). Hypoxiában ugyanakkor az Ado kináz gátlódik (az ADA aktivitása is csökken; Szentmiklósi és mtsai, 1983), ami jelentős intracelluláris Ado felhalmozódást okozva megfordítja a NT-ot. Ez a mechanizmus a normoxiában Ado fogyasztó cardiomyocytákat hypoxiában Ado termelőkké változtatja. Ezzel összhangban megfelelő oxigén- és tápanyagellátás mellett a NT blokádjá fokozza az Ado sejtfelszíni receptorokon keresztül mediálódó hatásait (összefoglalóként ld.: Deussen, 2000a, 2000b; De Jong és mtsai, 2000), de nagyfokú ischaemiában ez gátlásba fordul át, mivel az Ado kijutása akadályozódik a sejtekből (Schreieck és Richardt, 1999).

Ischaemiában emellett az intracelluláris acidózis hatékonyan gátolja az endo-5'-nukleotidáz is (Bak és Ingwall, 1998), ami mérsékli (de nem akadályozza meg) az Ado kináz gátolt állapota miatti többlet Ado-termelést. Az Ado kináz és az endo-5'-nukleotidáz aktivitásának együttes szuppressziója eredő hatásában egyrészt csökkenti az ischaemiás myocardium energiaigényét, másrészt emeli a szöveti Ado-szintet, amely beindítja a szív protektív és reparatív adenozinerg folyamatait, harmadrészt pedig védi a sejtek AMP készletét, ami a reperfüzió során gyorsabb ATP reszintézist tesz lehetővé (Headrick és mtsai, 2003).

Az intenzív és szabályozott enzim- illetve transzporttevékenység következtében az Ado rövid féléletidejű és erősen kompartmentalizált molekula, melynek mennyisége a sejtek energetikai egyensúlyát felborító zavar esetén mind extra-, mind intracellulárisan megnő, s ezzel protektív folyamatokat indít be (összefoglalóként ld.: Deussen, 2000a, 2000b; Fredholm és mtsai, 2001; Headrick és mtsai, 2003).

### **2.3. Az adenzin interstitialis koncentrációjának mérése**

Az Ado a szívben két támadásponttal képes iniciálni az ischaemiás-hypoxiás inzultusokkal szembeni védekezést: egyrészt sejtfelszíni Ado receptorokon keresztül, másrészt intracellulárisan (ún. metabolikus hatás). Mivel a kardioprotektív hatásért elsősorban a sejtfelszíni Ado receptorok, főleg az  $A_1$ , kisebb részben az  $A_3$  altípus aktivitása felelős (Peart és mtsai, 2003), kitüntetett jelentősége van az interstitialis folyadék Ado koncentrációjának ( $[Ado]_{ISF}$ ) és különböző behatások során az ebben beálló változásoknak. Jelenleg többféle módszert használnak a működő szívben közvetlenül nem mérhető  $[Ado]_{ISF}$  becslésére. Az 1. táblázat rágcsálókön végzett mérések eredményeit szemlélteti, a kapott értékek extrém tág, a nanomoláristól a mikromolárisig terjedő tartományban mozognak.

A legmagasabb bazális  $[Ado]_{ISF}$  értékeket a myocardialis interstitium mikrodialízisével (160 nM - 2.8  $\mu$ M), illetve az endocardiális „well” technikával (3.6 - 4.6  $\mu$ M) nyerték. (A „well” porózus falú korong vagy zacskó, amelynek folyadéktartalma a meghatározandó szövetrel szoros kontaktusba helyezve annak interstitialis folyadékával ekvilibráliódik a permeábilis anyagokra nézve. Ezek koncentrációit a „well” folyadékában lemérve következtetni lehet a szöveti koncentrációkra.)

A pericardialis transzudátumból és az epicardialis „well” folyadékából meghatározott bazális  $[Ado]_{ISF}$  100 - 400 nM között mozog. Az epicardialis és az endocardiális értékek figyelemreméltó, egy nagyságrendnyi transzmurális  $[Ado]_{ISF}$  különbséget mutatnak (Zhu és mtsai, 1991; Zhu és mtsai, 1992; ld.: 1. táblázat). A bazális  $[Ado]_{ISF}$  legalacsonyabb becsült értékeit (tengerimalacon 2.6 - 25 nM,

kutyán 92 - 220 nM között) az ún. „axially distributed modeling” segítségével határozták meg, ami az arteriovenózus Ado koncentrációkülönbség, a hematokrit és a coronaria-perfúzió alapján végzett összetett számítás (Kroll és Stepp, 1996; Stepp és mtsai, 1996). Ezzel a módszerrel korábbi kísérletek adataiból is lehet becslést tenni (Bassingthwaighte, 1992). A különböző eljárással meghatározott  $[Ado]_{ISF}$  értékek skálája három nagyságrendet (!) ölel fel (1. táblázat). Ez a változatosság feltehetően egyrészt az egyes módszerek által okozott szöveti sérülések eltérő mértékére, másrészt a mintavétel során megcélzott szöveti kompartmentek eltérő voltára vezethető vissza.

---



---

### **Becslés myocardialis interstitiumból mintavételezett folyadék alapján**

---



---

#### *Mikrodialízis perfuzátum*

160 nM; *in vitro* patkány; Ninomiya és mtsai, 2002  
 270 nM; *in vivo* patkány; Headrick, 1996  
 400-500 nM; *in vitro* patkány; Harrison és mtsai, 1998  
 470 nM; *in vitro* patkány; Van Wylen és mtsai, 1992  
 2.8  $\mu$ M; *in vivo* patkány; Obata és mtsai, 2001

---

#### *Peri- vagy epicardialis transzudátum, infuzátum, illetve „well” tartalma*

---

$\approx$ 100-250 nM; *in vitro* patkány; Perlini és mtsai, 1998  
 180 nM; *in vitro* tengerimalac; Decking és mtsai, 1988  
 191 nM; *in vitro* tengerimalac; Mohrman és Heller, 1990  
 300 nM; *in vitro* tengerimalac; Zhu és mtsai, 1991 (endocardialis „well” módszerrel viszont: 3.6  $\mu$ M)  
 327 nM; *in vitro* tengerimalac; Zhu és mtsai, 1992 (endocardialis „well” módszerrel viszont: 4.6  $\mu$ M)

---



---

### **Becslés a nagyvérköri arteriális és coronaria-vénás Ado szintek alapján**

---



---

2.6-9.4 nM; *in vitro* tengerimalac; Gorman és mtsai, 1991  
 6.8 nM; *in vitro* tengerimalac; Wangler és mtsai, 1989  
 20-25 nM; *in vitro* tengerimalac; Kroll és mtsai, 1992  
 34 nM; *in vitro* tengerimalac; Deussen és mtsai, 1999  
 (összefoglalóként ld.: Bassingthwaighte, 1992)

---

**1. táblázat.** Szemelvény az irodalomban található  $[Ado]_{ISF}$  értékekből, melyeket jelenleg is elfogadott és alkalmazott módszerekkel határoztak meg tengerimalac és patkány szívben. A koncentrációk a sorok elején a bazális  $[Ado]_{ISF}$  értékei. Az *in vitro* és *in vivo* megjelölések a vizsgálat jellegét mutatják; nM: nmol/l;  $\mu$ M:  $\mu$ mol/l.

Metabolikusan intakt szívben nettó extracelluláris Ado termelés és ezzel összefüggően nettó intracelluláris Ado elimináció van, ezért a transzmembranális NT gátlása növeli az  $[Ado]_{ISF}$ -t (Deussen, 2000a, 2000b). A bazális  $[Ado]_{ISF}$

értékek nagy szórásával összhangban, az  $[Ado]_{ISF}$  növekedése ENT1-gátló dipiridamol (DP) illetve NBTI jelenlétében szintén elég széles tartományban mozog, az alkalmazott módszer függvényében (2. táblázat).

---

---

### **Becslés a peri- vagy epicardialis transzudátum, illetve „well” tartalma alapján**

---

---

180 nM; DP (0.1  $\mu$ M):  $\approx 1 \mu$ M;  $\Delta[Ado]_{ISF}$ : **820 nM**; Decking és mtsai, 1988

191 nM; DP (10  $\mu$ M): 2  $\mu$ M;  $\Delta[Ado]_{ISF}$ : **1.8  $\mu$ M**; Mohrman és Heller, 1990

---

---

### **Becslés a nagyvérköri arteriális és coronaria-vénás Ado szintek alapján**

---

---

6.8 nM; DP (10  $\mu$ M): 191 nM;  $\Delta[Ado]_{ISF}$ : **184.2 nM**; Wangler és mtsai, 1989

34 nM; NBTI (10  $\mu$ M): 94 nM;  $\Delta[Ado]_{ISF}$ : **60 nM**; Deussen és mtsai, 1999

**2. táblázat.** A bazális  $[Ado]_{ISF}$  növekedése NT gátlás hatására *in vitro* meghatározva tengerimalac szívbén. A bazális  $[Ado]_{ISF}$  a sorok elején található. A DP és az NBTI koncentrációit az NT gátló rövidítése után tüntettük fel zárójelben, ezt követi az  $[Ado]_{ISF}$  NT gátló jelenlétében mért értéke. Az  $[Ado]_{ISF}$  változását ( $\Delta[Ado]_{ISF}$ ) félkövéren szedtük. nM: nmol/l;  $\mu$ M:  $\mu$ mol/l.

## **2.4. Koncentrációváltozás becslése a Langmuir-Hill egyenlettel**

Erlich 1887-ben kidolgozott modellje szerint a bioaktív anyagok az élő szövetekben specifikus kötőhelyekkel („receptorokkal”) való kapcsolódás révén válnak képessé hatásuk kifejtésére. Napjainkban receptor alatt olyan struktúrát értünk, melynek a ligand specifikus megkötésén túl („kognitív” funkció) jelerősítő szerepe is van (transzducer funkció), amennyiben persze a ligand agonista („cselekvőképes”) és nem antagonist (,cselekvőképtelen”) jellegű. A ligand és a receptor kapcsolatát kvantitatíve elsőként Hill jellemezte (Hill, 1909, 1910). Mivel néhány évvel később tőle függetlenül ugyanezt az összefüggést Langmuir is leírta a gázok fémfelületen való adszorpciójára, a kérdéses egyenletet ma Hill illetve Langmuir egyenletnek is hívják.

A Langmuir-Hill egyenlet nemcsak a receptor „kognitív” funkciójára (ligandkötés) írható fel, hanem a teljes receptorfunkcióra is:

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

ahol:  $c$  az agonista koncentrációja;  $E$  a hatás  $c$ -nél;  $E_{max}$  az adott agonistával kiváltható maximális hatás (hatékonyság; „efficacy”);  $EC_{50}$  a félhatásos koncentráció, ennek reciproka a hatásereőség („potency”);  $n$  a Hill koefficiens („slope”).

A Langmuir-Hill egyenlet tehát a hatóanyag koncentrációja és a kiváltott biológiai válasz közötti kapcsolatot három állandó segítségével írja le ( $E_{max}$ ,  $EC_{50}$ ,  $n$ ). Ha egy adott farmakon és egy adott receptor esetében ismerünk több koncentráció-hatás párt, vagyis egy koncentráció-hatás ( $E/[A]$ ) görbét, akkor erre a Langmuir-Hill egyenletet illesztve a három állandó értéke nagy pontossággal megbecsülhető (regresszióanalízis). Másrészt, a fent említett öt mennyiségből ( $c$ ,  $E$ ,  $E_{max}$ ,  $EC_{50}$ ,  $n$ ) bármelyik négy ismeretében az ötödik algebrai úton is kiszámolható a Langmuir-Hill egyenlet segítségével.

Vagyis, elvi lehetőség van a bazális  $[Ado]_{ISF}$ -tól való eltérés kiszámolására, amennyiben pontosan meg tudjuk határozni az Ado és valamely sejtfelszíni receptora közötti kapcsolat három jellemzőjét ( $E_{max}$ ,  $EC_{50}$ ,  $n$ ).

## 2.5. Koncentrációváltozás becslése koncentráció-hatás görbe regresszióanalízisével

A regresszióanalízissel végzett koncentrációváltozás-becslés a receptorműködés telíthetőségén alapszik. Ha egy biológiai rendszerben egy agonistával úgy veszünk fel  $E/[A]$  görbét, hogy a rendszerben már induláskor jelen van az adott agonista egy  $c_x \neq 0$  koncentrációja, a kiértékelés során figyelembe kell venni a  $c_x$ -et mind a kiindulási állapot, mind a  $E/[A]$  görbe válaszainak létrehozásában. Ha a  $c_x$ -et figyelmen kívül hagyjuk, akkor a kapott válaszok el fognak térni a korrekt módon számíthatóktól (illetve azoktól, amelyeket  $c_x = 0$  esetén kapnánk). A válasz torzulása függ a  $c_x$  nagyságától, melyet a Függelékben illusztráltunk (12.1. Egymást követő agonista-dózisok hatásának megjelenése a receptorfunkcióban). A válasz torzulása és a torzulást okozó koncentráció ( $c_x$ ) között az alábbi összefüggés áll fent (Gesztelyi és mtsai, 2004):

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

ahol:  $c_x$  a E/[A] görbe felvételét megelőzően már a rendszerben lévő agonistakonzentráció;  $E'$  a torzult válasz (a  $c_x$  ignorálásával számított hatás);  $c_{ad}$  a E/[A] görbe felvétele során bemért agonistakonzentráció;  $E_{\max}$ ,  $EC_{50}$  és  $n$  az intakt ( $c_x = 0$ ) E/[A] görbének a Langmuir-Hill egyenlet illesztésével nyert paraméterei, vagyis az intakt E/[A] kapcsolat leírói.

Ha egy rendszer, amelynek ismerjük az intakt E/[A] kapcsolatát egy adott agonistával, az adott agonistára megváltozott választ ad, akkor ennek egyik lehetséges oka a receptorok (illetve a posztreceptorális jelátvitel) előzetes részleges aktivációja. Ebben az esetben, ha a fenti egyenletbe beírjuk az intakt E/[A] kapcsolat paramétereit ( $E_{\max}$ ,  $EC_{50}$ ,  $n$ ), majd az egyenletet a torzult E/[A] görbe pontjaira illesztjük, regressziós paraméterként ( $c_x$ ) megkapjuk a E/[A] görbe agonistájának azt a koncentrációját, amelyik (előzetesen bemérve) azonos (vagy hasonló) módosulást képes létrehozni a E/[A] görbében, mint amit tapasztaltunk. A  $c_x$  akkor adja meg (abszolút módon) a torzító koncentrációt, ha a torzulás oka a E/[A] görbe felvételéhez használt agonista egy már előzetesen is jelen lévő koncentrációja. Ha a torzulást okozó anyag nem azonos a E/[A] görbe agonistájával, a  $c_x$  a E/[A] görbe agonistájának azt a koncentrációját adja meg, amelyik a torzító koncentrációval ekvivalens a vizsgált hatás szempontjából (Gesztelyi és mtsai, 2004). A  $c_x$  ebben az esetben is informatív, viszont csak relatív mutatója a torzító koncentrációnak. A fenti összefüggést a továbbiakban „koncentráció-meghatározó” egyenletnek nevezzük, levezetése a Függelékben található (12.2. A koncentráció-meghatározó egyenlet levezetése).

Megállapíthatjuk, hogy a koncentráció-meghatározó egyenlet is elvi lehetőséget rejt magában az  $[Ado]_{ISF}$  változásainak meghatározására (abszolút mutatóval) vagy jellemzésére (relatív mutató segítségével), ha sejtfelszíni Ado receptorok megfelelően felvett E/[A] görbéjére illesztjük. Ennek előfeltétele azonban, hogy ismernünk kell az adott agonista és a receptor kapcsolatát leíró paramétereket ( $E_{\max}$ ,  $EC_{50}$ ,  $n$ ).

## 2.6. Az adenzin jelátvittele a szívben

Az adenzinerg mechanizmusok közül kiemelkedő fontosságú a szív működés patológiás körülmények közötti szabályozása. Noha a szívben mind a négy Ado receptor altípus kimutatható, a myocardiumon az  $A_1$  és az  $A_3$  altípusoknak, a szív ereiben pedig az  $A_{2A}$  altípusnak van jelentősége.

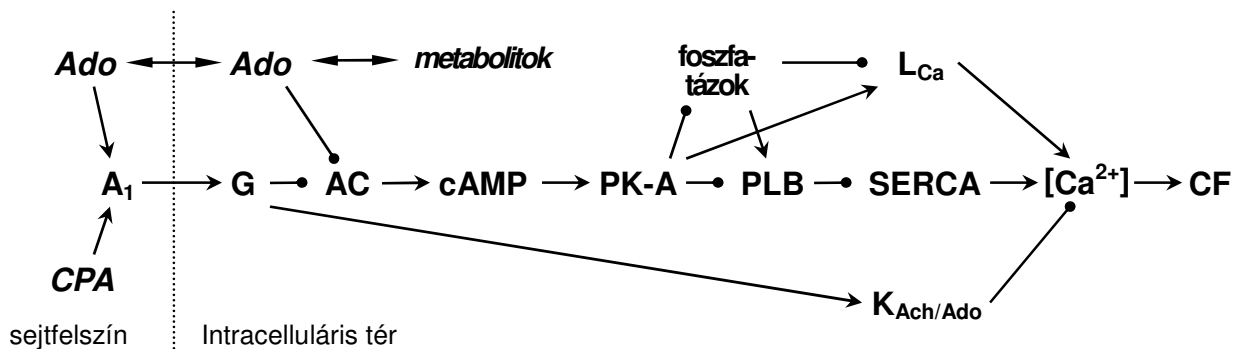
Az Ado receptorai ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ ,  $A_3$ ) G-proteinhez kapcsolt, a citoplazmatikus membránban elhelyezkedő receptorok, melyek kötőhelye az interstitium felé néz. Az  $A_1$  és  $A_3$  receptorok gátló jellegű, míg az  $A_{2A}$  és  $A_{2B}$  altípusok serkentő G-proteinhez kötődnek, ennek megfelelően előbbiek gátolják, utóbbiak serkentik az adenilcikláz (AC) működését. Az  $A_1$  és  $A_3$  receptorok aktiválják a foszfolipáz C és D működését is (az  $A_3$  altípus szignalizációjának ez a fő útvonala). Az  $A_1$  receptor nyitja mind a szarkolemmális, mind a mitokondriális ATP-szenzitív  $K^+$  csatornákat (utóbbiakat feltehetően az  $A_3$  receptor is). A supraventricularis szívizomban az  $A_1$  altípus a muszkarinos  $K^+$  csatorna ( $K_{Ach/Ado}$ ) konduktanciáját is növeli, kamrán a legtöbb speciesz esetén ez a hatás elhanyagolható a  $K_{Ach/Ado}$  alacsony denzitása miatt. Az  $A_{2A}$  és  $A_{2B}$  receptorok esetében is léteznek cAMP-független útvonalak, amelyek aktiválni látszanak a foszfolipáz C-t és a mitogén aktiválta protein kinázokat (MAPK). A hasonló működésű  $A_1$  és  $A_3$ , illetve  $A_{2A}$  és  $A_{2B}$  receptorpárok tagjai között sajátos különbség, hogy az  $A_1$  altípus legalább egy, az  $A_{2A}$  pedig több nagyságrenddel érzékenyebb az Ado-ra, mint az  $A_3$  illetve  $A_{2B}$  forma. (A fentieket részletesen ld.: Shryock és Belardinelli, 1997; Sommerschild és Kirkeboen, 2000; Fredholm és mtsai, 2001; Headrick és mtsai, 2003.)

Megemlítendő még az Ado egy relatíve jól feltérképezett intracelluláris kötőhelye, az AC-on található P-site, melyhez kötődve az Ado gyenge gátlást hoz létre az enzimen (Tesmer és mtsai, 2000).

Az Ado pitvari hatásaiban, különösen az Ado által okozott elektrofiziológiai eltérésekben, fontos szerep jut az  $A_1$  receptor mediálta  $K^+$ -konduktancia növekedésnek ( $K_{Ach/Ado}$  aktiváció révén). Jellegzetessége ennek a szignalizációs útnak, hogy a cAMP intracelluláris szintjétől függetlenül markáns hatást produkál, ami miatt „direkt” hatásnak nevezik. Kamrán az Ado csak a  $\beta$ -adrenerg receptoraktiváció (vagy más AC serkentő hatás) következményeit csökkenti,

vagyis az alapszint irányába viszi az AC működését, mérsékelve ezáltal a cAMP-függő protein kináz A általi foszforilációt (indirekt hatás). Ez az indirekt hatás egyébként pitvaron is megfigyelhető (összefoglalóként ld.: Belardinelli és mtsai, 1995; Shryock és Belardinelli, 1997).

A jelen disszertációban tárgyalt kísérleteinket állandó frekvencián ingerelt tengerimalac bal pitvarizomzaton végeztük, vagyis a fő pitvari Ado receptor típus, az  $A_1$  receptor negatív trop hatásai tisztán a kontrakciós erő változásaiban nyilvánulhattak meg. Ennek megfelelően munkánk során ezt a kimeneteli változót regisztráltuk, mint hatást. Az Ado negatív inotrop hatásának mechanizmusát tengerimalac pitvari munkaizomsejteken az alábbiakban részletesen összefoglaltuk (2. ábra).



**2. ábra.** A viszonylag stabil és szelektív  $A_1$  receptor agonista CPA, valamint a gyorsan metabolizálódó Ado szignálációjának konvergálása a kontrakciós erőre tengerimalac bal pitvari munkaizomsejten. Ado: adenzin; CPA: N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine;  $A_1$ :  $A_1$  receptor; metabolitok: az Ado metabolitjai; G: GTP-kötő fehérje (G-protein); AC: adenilcikláz; cAMP: 3',5'-ciklikus adenzin monofoszfát; PK-A: cAMP-függő protein kináz A; PLB: foszfolambán; SERCA: a szarkoplazmatikus retikulum Ca<sup>2+</sup>-ATP-áza; foszfatázok: intracelluláris foszoprotein foszfatázok; L<sub>Ca</sub>: L-típusú Ca<sup>2+</sup> csatorna; K<sub>Ach/Ado</sub>: muszkarin aktiválta K<sup>+</sup> csatorna; [Ca<sup>2+</sup>]: a citoszól Ca<sup>2+</sup> koncentrációja az akciós potenciál platófázisában; CF: kontrakciós erő;  $\longleftrightarrow$ : egyensúlyi folyamat;  $\longrightarrow$ : serkentés vagy mennyiségnövelés;  $\longrightarrow\bullet$ : gátlás vagy mennyiségcsökkentés.

A pitvari cardiomyocyták csak  $A_1$  receptorokat expresszálnak (Gardner és Broadley, 1999). A K<sub>Ach/Ado</sub> nyitásával és a cAMP szintjének csökkentésével párhuzamosan az  $A_1$  receptor stimulációja intracelluláris foszoprotein foszfatázokat is aktivál, ami hozzájárul a cAMP-dependens foszforiláció visszazorításához (Gupta és mtsai, 1993). A defoszforiláció felszabadítja a foszfolambán (PLB) gátló aktivitását a szarkoplazmatikus retikulum Ca<sup>2+</sup>-ATP-áz-



án (SERCA) (Gupta és mtsai, 1993; Neumann és mtsai, 1995), továbbá gátolja az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornát ( $\text{L}_{\text{Ca}}$ ) (Jahnel és mtsai, 1992). A SERCA felelős a citoszólbeli szabad  $\text{Ca}^{2+}$  diastole alatti visszapumpálásáért az SR-be, ezért csökkent működése a sejt (szarkolemmális  $\text{Ca}^{2+}$  csatornán keresztüli)  $\text{Ca}^{2+}$  veszteséhez vezet, ami csökkenti a későbbiekben a kontrakciós erőt. Az L-típusú inward  $\text{Ca}^{2+}$  áram gyengülése az akciós potenciál platófázisában szintén a kontrakciós erő csökkenésének irányában hat (összefoglalóként ld.: Bers, 2001).

Mint az a 2. ábrán látható, az inotropiát meghatározó intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -szintet az  $\text{A}_1$  receptorfunkció három ponton, az  $\text{L}_{\text{Ca}}$ , a SERCA és a  $\text{K}_{\text{Ach/Ado}}$  aktivitásának szabályozásával befolyásolja. E három tényező egymáshoz képesti jelentősége még nem teljesen tisztázott. Széles körben elfogadott vélemény szerint elsősorban a befelé egyenirányító  $\text{K}^+$  áram növekedése felelős az  $\text{A}_1$  receptor agonisták direkt (bazális cAMP-szint melletti) negatív inotrop hatásáért, mivel hiperpolarizálja a sejtet és ezzel rövidíti az akciós potenciált (Kurachi és mtsai, 1986; Belardinelli és mtsai, 1995).  $\text{K}^+$  csatorna blokkolókkal végzett kísérletek alapján Ford és Broadley (1999) arra következtettek, hogy a  $\text{K}_{\text{Ach/Ado}}$  aktivációja főleg a kontrakció időtartamát, kialakulási és lecsengési gyorsaságát befolyásolja, de kevéssé érinti a kontrakciós erő amplitúdóját. Az  $\text{A}_1$  receptor agonisták az emelkedett cAMP-szint következtében intenzívebbé vált L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  áramot erőteljesen csökkentik, a bazális cAMP-szint melletti L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  áramot azonban csak kisebb mértékben gátolják, és azt is csak pitvaron (Belardinelli és mtsai, 1995). A SERCA - PLB komplex szerepe kisebb jelentőségűnek látszik az Ado direkt negatív inotrop hatásában pitvaron, mint kamrán, mivel a PLB, amelyre a SERCA felé tartó szabályozási utak konvergálnak, pitvaron csak kis mennyiségben van jelen (Shenoy és mtsai, 2001).

## **2.7. A thyreoid hormonok hatása az adenozin jelátvitelére és metabolizmusára a szívben**

A tartósan jelenlévő thyreoid hormonok mennyisége és a myocardialis  $\text{A}_1$  receptorok válaszkészsége között reciprokok összefüggés van, ami megnyilvánul az  $\text{A}_1$  receptor agonisták hyperthyreosisban tapasztalt csökkent negatív inotrop

hatásában is (Szentmiklósi és mtsai, 1992; Kaasik és mtsai, 1994). A jelenség mechanizmusát a számos vizsgálat ellenére még nem ismerjük minden részletében, azt viszont tudjuk, hogy az A<sub>1</sub> receptorok jelátvitelének több szereplőjét is befolyásolják a thyreoid hormonok.

Az A<sub>1</sub> receptorok száma változatlan marad (Bumgarner és mtsai, 1989) vagy emelkedik T<sub>3</sub> és T<sub>4</sub> tartós jelenlétében (El-Ani és mtsai, 1994; Kaasik és mtsai, 1994), így a negatív inotrop hatás csökkenése nem magyarázható az Ado receptor-denzitásban beállt változással. Ismeretes olyan közlemény, amely az Ado receptorszám csökkenésről számol be (Rapiejko és mtsai, 1987), de ahogy azt Bumgarner és mtsai (1989) kifejtették, ebben a vizsgálatban agonistát használtak a ligandkötési assay-hez, ami miatt eredményüket kritikával kell fogadni, mivel az agonista assay csak az aktuálisan G-proteinhez kötődött A<sub>1</sub> receptorokat mutatja ki, a disszociált állapotban lévőket nem. Az A<sub>1</sub> receptorok ligandjaikkal szembeni affinitásában sem tapasztaltak változást hyperthyreosisban (El-Ani és mtsai, 1994), és a fent említett vizsgálatok egyike sem talált a G-proteinek koncentrációjában szignifikáns eltérést.

Az AC szintjének illetve aktivitásának változása ellentmondásos. Pracyk és Slotkin (1991) hyperthyreoid patkányban  $\beta$ -receptoraktiváció során fokozott szignáltranszdukcióról tesznek említést, amelyben az AC is érintett, mások csak a tendenciát találták hasonlóknak, de szignifikáns eltérés nélkül (El-Ani és mtsai, 1994). Bumgarner és mtsai (1989) patkány zsírsejteken az AC csökkent működését tapasztalták hyperthyreoid állapotban az A<sub>1</sub> receptor – AC rendszer vizsgálata során. Újabb eredmények szerint hyperthyreota patkány szívében az AC mennyisége nem, de aktivitása csökken, ennek következtében a nagyobb  $\beta$ -receptorszám ellenére a  $\beta$ -receptor agonisták hatása nem változik lényegesen (Ojamaa és mtsai, 2000a).

A thyreoid hormonok növelik a SERCA mennyiségét és funkcióját, ugyanakkor csökkentik a mennyiségét és a hatékonyságát a SERCA gátló regulátorának, a PLB-nak (Takács és mtsai, 1985; Arai és mtsai, 1991; Kiss és mtsai, 1994; Ojamaa és mtsai, 2000b). Ez pitvarra és kamrára egyaránt jellemző, de eltérő mértékben (Kaasik és mtsai, 1997a; Seppet és mtsai, 1998; Shenoy és mtsai, 2001). A SERCA pitvaron és kamrán közel hasonló mennyiségben van jelen, de extra T<sub>3</sub> illetve T<sub>4</sub> hatására a pitvaron lényegesen nagyobb az expresszió fokozódása, mint kamrán. Euthyreota pitvaron a PLB a kamrához képest jóval

kisebbségi mennyiségben fordul elő, hyperthyreoiddá válva viszont a csökkenés mértéke hasonló pitvaron és kamrán. Shenoy és mtsai (2001) vizsgálatában a SERCA/PLB arány patkány pitvaron 1.9-ről 5.4-re nőtt, míg kamrán csak 0.3-ről 0.4-re. Érdekes, hogy míg a kontraktilitási és relaxációs paraméterek (+dT/dt, -dT/dt) ennek a trendnek megfelelően változtak (Kaasik és mtsai, 1997a; Shenoy és mtsai, 2001), a kontrakciós erő amplitúdója csak kamrán nőtt, pitvaron változatlan maradt (Kaasik és mtsai, 1997a). A SERCA/PLB arány növekedése pozitív inotrop és lusitrop hatású, de a  $\beta$ -adrenerg stimulációra adható válasz csökkenését vonja maga után (Kaasik és mtsai, 1997b). Ennek az az oka, hogy a cAMP-függő szabályozási utak a PLB-on keresztül hatnak a SERCA-ra, a PLB mennyiségének thyreoid hormon-függő csökkenése pedig ezt a kaput szűkíti. Ez az  $A_1$  receptor jelátvitelének egyik útvonalát is érinti (2. ábra), ami feltehetően hozzájárul az  $A_1$  receptor agonisták csökkent hatásához hyperthyreota szíven. Ennek a mechanizmusnak azonban pitvaron nincs jelentős szerepe, mert a pitvar PLB tartalma mind euthyreoid, mind hyperthyreoid állapotban jóval kisebb a kamráénál (Shenoy és mtsai, 2001), ami miatt az Ado pitvari hatásában (különösen a direkt hatásban) a SERCA - PLB komplex kis súllyal szerepel.

Hyperthyreoid állapotban nő a szarkolemmális L-típusú  $Ca^{2+}$  áram is (Rubinstein és Binah 1989; Mager és mtsai, 1992; Kreuzberg és mtsai, 2000), melynek hátterében egyes szerzők az  $L_{Ca}$  denzitásának növekedését találták (Kreuzberg és mtsai, 2000), míg mások az  $L_{Ca}$  csökkenését (Seppet és mtsai, 1993; Göttsche, 1994). A  $T_3$  és  $T_4$  fokozzák a ryanodine receptor expresszióját is, tovább növelve az SR  $Ca^{2+}$  forgalmát (Arai és mtsai, 1991). Cernohorsky és mtsai (1998) szerint a  $Na^+$  -  $Ca^{2+}$  cserélő és a  $Na^+/K^+$ -ATP-áz funkciója nem módosul lényegesen, míg Shenoy és mtsai (2001) a  $Na^+$  -  $Ca^{2+}$  cserélő/SERCA arány kifokú csökkenését találták pitvaron és kamrán is. Mindez az SR részvételének thyreoid hormon-függő növekedését mutatja a  $Ca^{2+}$  tranziens létrehozásában. Összefoglalásul elmondható, hogy a  $Ca^{2+}$  homeosztázis fehérjéinek többsége közös célpontja szíven a thyreoid hormonoknak és az Ado-nak.

Megemlítendő, hogy kamrán a thyreoid hormonok a  $\beta$  típusú miozin nehézlánc ( $\beta$ -MHC) helyett az  $\alpha$ -MHC expresszióját serkentik, míg pitvaron a thyreoid státustól függetlenül  $\alpha$ -MHC fordul elő (Bottinelli és mtsai, 1995). Az  $\alpha$  izoforma mennyisége azonban pozitív korrelációt mutat a thyreoid hormonok szintjével pitvaron és kamrán egyaránt (Shenoy és mtsai, 2001).

Hyperthyreoid állapotban nő a cardiomyocytákon a NT maximális kapacitása (Smolenski és mtsai, 1995). A nagyobb transzportkapacitás csökkenti az extracelluláris Ado kapcsolódási esélyét a sejtfelszíni Ado receptorokhoz, ami csökkentheti az Ado-nal szembeni válaszkészséget, elsősorban a hatásereőséget („potency”). A NT változása befolyásolhatja azoknak az exogén Ado receptor agonistáknak a hatását is, amelyek transzportábilisak és amelyeket az intracelluláris enzimek át tudnak alakítani, ezekre nézve ugyanis mindig koncentráció-grádiens fog fönnállni a sejtmembrán két oldalán (amíg a beadott mennyiség el nem fogy). Mivel a relatíve stabil Ado receptor agonistákkal szembeni válaszkészség is csökken hyperthyreosisban (Szentmiklósi és mtsai, 1992), a fokozott NT kapacitás csak részben lehet felelős az Ado kisebb hatásereőségéért hyperthyreota szívben.

Smolenski és mtsai (1995) az Ado kináz (az intracelluláris Ado fő eliminálója) aktivitásának növekedését tapasztalták hyperthyreosisban, igaz, a kisebb jelentőségű ADA aktivitásának csökkenésével együtt. Tekintettel a stabil analógok viselkedésére (Szentmiklósi és mtsai, 1992), a fokozott intracelluláris eliminációs kapacitás sem lehet a kizárólagos oka az  $A_1$  receptor agonisták csökkent hatásának hyperthyreosisban, a nagyobb NT kapacitással együtt sem.

Más Ado-t metabolizáló enzim is érzékeny a thyreoid hormonszintre, Smolenski és mtsai (1995) az ekto-5'-nukleotidáz (az extracelluláris Ado-termelés kulcsenzime) aktivitásának csökkenéséről számoltak be, amely szerintük (az Ado kináz fokozott működésével együtt) a hyperthyreoid myocardiumon  $[Ado]_{ISF}$  csökkenést okozna. Újabb eredmények ezt nem erősítették meg, Carneiro-Ramos és mtsai (2004) patkány cardiomyocytákon az ekto-5'-nukleotidáz aktivitásának növekedését írták le  $T_3$  kezelés után, melynek háttérében az enzim mRNS-ének fokozott transzkripcióját mérték ki.

Mint a fentiekből is kitűnik, a  $T_3$  és  $T_4$  tartós jelenléte sokrétűen, de kellően nem tisztázott mértékben és módon befolyásolja a myocardialis Ado mennyiségét, eloszlását, valamint részvételét az adenozinerg működésben. Ez pedig annál is inkább fontos lenne, mivel újabb adatok arra engednek következtetni, hogy a thyreoid hormonok extra mennyisége a jól ismert kedvezőtlen hatásokon túl (tachycardia, hyperdynamias keringés) az ischaemiás prekondicionáláshoz hasonló jellegű kardioprotektív hatást képes kifejteni (Pantos és mtsai, 2004).

### 3. Célkitűzések

Az Ado protektív és regenerációt elősegítő hatásai a szívben döntően  $A_1$ , kisebb részben  $A_3$  receptorokon keresztül mediálódnak. Mivel ezek kötőhelye az extracelluláris tér felé néz, a kardioprotektív mechanizmusok szempontjából kitüntetett jelentősége van a bazális  $[Ado]_{ISF}$ -nak illetve az ebben beálló változásoknak. A becsült bazális  $[Ado]_{ISF}$  értékek három nagyságrendre való kiterjedését az alkalmazott mérőmódszertől való nagyfokú függés okozza, amely felveti új, megbízhatóbb módszer kidolgozásának szükségességét. Ezzel összhangban megvizsgáltuk, felhasználható-e a klasszikus Langmuir-Hill egyenlet és az ebből levezetett „koncentráció-meghatározó” egyenlet az  $[Ado]_{ISF}$  változásának mérésére. Mivel a NT gátlása metabolikusan intakt szívizomzaton erőteljesen növeli az  $[Ado]_{ISF}$ -t, ennek meghatározását tűztük ki első célunkul.

Ismert, hogy a thyreoid hormonok ( $T_3$ ,  $T_4$ ) több ponton is befolyásolják az  $A_1$  receptor mediálta jelátvitelt, melyek eredőjeként hyperthyreoid szíven az  $A_1$  altípus agonistái csökkent választ váltanak ki. Legjobb tudomásunk szerint azonban nincs adat arra nézve, hogy mi a thyreoid hormonok hatása a myocardialis  $[Ado]_{ISF}$ -ra és ennek változására NT gátlás alatt, noha ezek az információk hozzájárulnának a  $T_3$  és  $T_4$  szívre kifejtett hatásainak pontosabb felderítéséhez. Második célunk ezért annak vizsgálata volt, hogyan befolyásolja a hyperthyreosis a NT blokádnak hatását az  $[Ado]_{ISF}$ -ra. Ez lehetőséget teremtett arra is, hogy gyakorlati probléma megoldására használjuk fel frissen tesztelt módszerünket, a koncentráció-meghatározó egyenlet illesztésén alapuló RRM-et.

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. Oldatok

Kísérleteinkhez a következő vegyületeket használtuk: adenosine (adenozin, Ado); N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine (CPA); dipyridamole (dipiridamol, DP); S-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-6-thioinosine (NBTI); adenzin dezamináz (ADA); L-tiroxin Na-sójának pentahidrátja (T<sub>4</sub>). Valamennyi vegyszert a Sigma (St. Louis, MO, USA) állította elő, kivéve az ADA-t, amelyet a Boehringer gyártott.

Az Ado-t 36 °C-os módosított Krebs-Henseleit pufferben (Krebs oldat) oldottuk fel, melyet a következő összetétellel készítettünk (mM): NaCl: 118; KCl: 4.7; CaCl<sub>2</sub>: 2.5; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1; MgCl<sub>2</sub>: 1.2; NaHCO<sub>3</sub>: 24.9; D-glükóz: 11.5; acidum ascorbicum: 0.1 (bidesztillált vízben oldva). A 10 mM CPA törzsoldatot etanol és víz 1:4 (V/V) arányú oldatával készítettük, ezt Krebs oldattal hígítottuk tovább. A DP-t 96% etanolban, az NBTI-t dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk fel. Az etanol illetve a DMSO koncentrációja a szervkádakban sosem haladta meg a 0.2 V/V %-ot. Az ADA-t gyári glicerines oldatában mértük be. A T<sub>4</sub> fiziológiás sóoldatban került felhasználásra, amely a T<sub>4</sub> előzetes, 3 M NaOH oldatban való feloldása miatt 0.01 m/V % NaOH-ot tartalmazott.

A preparátumok tápoldata minden esetben 36 °C-os Krebs oldat volt.

### 4.2. Szöveti preparátumok

#### 4.2.1. Állatok

Kísérleteinket 500-700 g testtömegű tengerimalacokból eltávolított bal pitvarokon végeztük. Az állatok tartása, előkezelése és feldolgozása összhangban volt a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottságának Etikai Kódexében megfogalmazottakkal és az ide vonatkozó Európai Unió előírásokkal.

#### 4.2.2. Tiroxinkezelés

Annál a vizsgálatnál, amelynél a cél az eu- és a hyperthyreoid állapot összehasonlítása volt, az állatokat random módon két részre osztottuk: T<sub>4</sub> kezelt és oldószerkezelt (S kezelt) csoportra.

A T<sub>4</sub> kezelt csoport tagjai 330 µg/testtömeg kg T<sub>4</sub>-t kaptak naponta egyszer intraperitoneálisan, míg az S kezelt csoport állatai a T<sub>4</sub> oldószerét kapták, ugyanolyan módon (*in vivo* kezelés). A kezelés 8 napig tartott, az állatok felhasználása a 9. napon történt.

#### 4.2.3. Bal pitvari preparátum készítése

A tengerimalacot egyetlen erőteljes tarkócsapással öltük le. A mellkas feltárása után a szívet eltávolítottuk és szobahőmérsékletű, oxigenált Krebs oldatba helyeztük. A bal pitvart levágtuk, majd az apex auriculae-ra és a vágott szél ettől legtávolabbi pontjára egy-egy kapillaritásmentes vékony fonalat csomóztunk. Az apexre kötött fonalat teflon szervtartó („tuskó”) alsó részéhez rögzítettük, majd a tuskót (fennmaradó térfogatában) 10 cm<sup>3</sup>-es, Krebs oldattal feltöltött szervkádba (TSZ-04, Experimetria, Budapest) helyeztük (3. ábra). A Krebs oldatot 95% O<sub>2</sub> és 5% CO<sub>2</sub> elegyével oxigenáltuk, ami által pH-ja 7.4-re állt be. A pitvar másik fonalát izometriás mechano-elektromos átalakító („transzducer”; SG-01 D, Experimetria, Budapest) érzékelőjéhez rögzítettük, majd a pitvart 10 mN függőleges irányú alapfeszítés alá helyeztük, melyet a kísérlet folyamán (közvetlenül a mosások után) rendszeresen utánkorigáltunk.

#### 4.2.4. A preparátumok előinkubációja

A pitvarokat programozható elektrostimulátorral (ST-02, Experimetria, Budapest) ingereltük a tuskón található, pontszerűen kiképzett platina elektródokon keresztül. Az ingerlést 3 Hz frekvenciával, 1 ms impulzusszélesség mellett, másfélszeres küszöbfeszültséggel (kb. 1 V) végeztük. A kontrakciókkal arányos elektromos jeleket 6 csatornás poligráfon (BR-61, Medicor, Budapest) rögzítettük. Az ingerlés megkezdése után valamennyi pitvart 50 percen keresztül inkubáltuk Krebs oldatban, ami alatt a kontraktilitási paraméterek stabilizálódtak.

Az inkubáció során (itt és más alkalommal is) a szervkádak oldatát 15-20 percnként cseréltük (mosás). A pitvarokat az előinkubáció alatt random módon csoportokba illetve alcsoportokba soroltuk (ld.: 4.3.2. Az *in vitro* kezelés).



**3. ábra.** Egy szervkád (átlátszó üveg) a tetejére helyezett fehér teflon tuskóval. Az ábrán csaknem vízszintes tuskó függőleges helyzetben kerül be a duplafalú szervkád belsejébe levő Krebs oldatba. A szervkád két fala között („köpeny”) a termosztáló folyadék kering. A két piros csapon keresztül lehet a Krebs oldatot betölteni illetve leengedni. A szervkád mögött (a kép felső-középső részén) látható a transzducer, amely a szervkád fölé fordítható. Ettől jobbra fent az ejtőtartály alja látszik (átlátszó üveg), amelyből az előmelegített friss Krebs oldat a szervkád belsejébe juttatható.

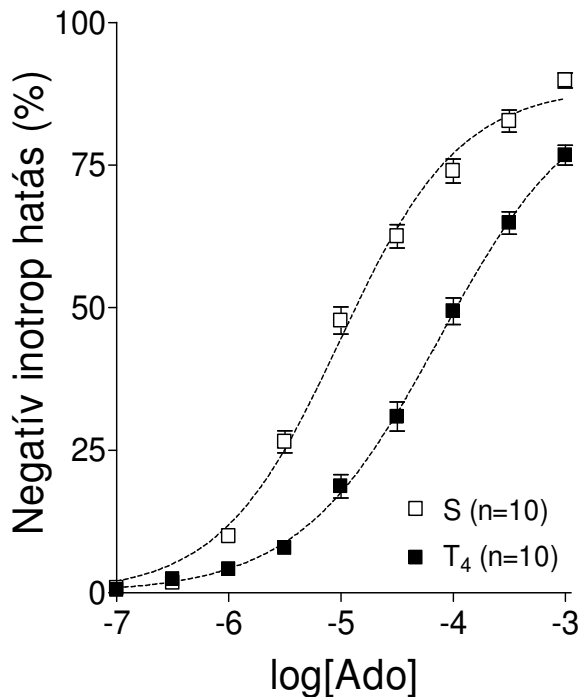
### 4.3. Kísérleti protokollok

A  $E/[A]$  görbék felvételét Van Rossum (1963) kumulatív módszere szerint végeztük. A vizsgálat során az izometrikus kontrakciókat regisztráltunk, melyeknek az amplitúdóját értékeltük, mint kontrakciós erőt.

#### 4.3.1. Az Ado-nal felvett $E/[A]$ görbe

Elsőként valamennyi kísérleti csoportban illetve alcsoportban kumulatív  $E/[A]$  görbét vettünk fel Ado-nal. A hatás beálltát az adott dózis beadása után kialakuló legkisebb kontrakciós erő jelezte (4. ábra).





**4. ábra.** Oldószerkezelt (S) és tiroxinkezelt (T<sub>4</sub>) tengerimalacokból származó bal pitvarok tipikus Ado E/[A] görbéi. Az x tengelyen az Ado koncentrációjának tízes alapú logaritmusát tüntettük fel, az y tengelyen pedig a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenését (ld.: 4.4. Adatfeldolgozás). A szimbólumok átlagolt válaszokat mutatnak (számtani közép ± SEM). A válaszokra a Langmuir-Hill egyenletet (ld.: 4.4.3. A koncentráció-hatás görbék feldolgozása) illesztettük (szaggatott vonal).

Az Ado E/[A] görbe a következő célokat szolgálta:

- (1.) biztosította a preparátumok „edzését” a későbbi E/[A] görbe előtt (a legtöbb receptortípus esetében kisebb szórású E/[A] görbe vehető fel, ha a receptorokat röviddel a E/[A] görbe felvétele előtt átmenetileg agonista hatásnak tesszük ki);
- (2.) verifikálta a T<sub>4</sub> hatásának beálltát a pitvarokon (4. ábra);
- (3.) az általa nyert adatok alapján zártuk ki az anomális pitvarokat a vizsgálatból (ld.: 4.4.1. Beválasztási kritériumok);
- (4.) igazolta az azonos *in vivo* kezelésű alcsoportok homogenitását az Ado-ra adott válasz szempontjából, ami nem mellékes az A<sub>1</sub> receptorfunkció későbbi vizsgálata szempontjából.

Az Ado mint A<sub>1</sub> receptor agonista különösen alkalmas ilyen előzetes tájékozódásra, mert a T<sub>4</sub> kezelés markánsan megváltoztatja a rá adott választ, továbbá igen rövid (másodperces nagyságrendű) felezési ideje miatt a beadott mennyiség gyorsan és teljesen kiürül a preparátumból, így a következő E/[A] görbét nem zavarja.

### 4.3.2. Az *in vitro* kezelés

Az Ado E/[A] görbe felvételét követő mosás után 50 perces inkubáció következett (*in vitro* kezelés), ennek jellege határozta meg, milyen csoportba (illetve alcsoportba) tartozott a továbbiakban az adott preparátum. Első vizsgálatsorozatunkban *in vivo* kezeletlen állatokat használtunk fel, ebben az *in vitro* kezelés a következő csoportokat alakította ki:

- (1.) Krebs oldat: kontroll csoport (n=11)
- (2.) 10  $\mu$ M DP: DP csoport (n=9)
- (3.) 10  $\mu$ M NBTI: NBTI csoport (n=10).

Második vizsgálatsorozatunkban az *in vivo* kezelés két csoportot eredményezett (S illetve T<sub>4</sub> kezelt), melyeket az *in vitro* kezelés három-három alcsoportra bontott:

- (1.) Krebs oldat: S kontroll alcsoport (n=10)
- (2.) 10  $\mu$ M NBTI: S & NBTI alcsoport (n=8)
- (3.) 2 U/ml ADA + 10  $\mu$ M NBTI: S & ADA+NBTI alcsoport (n=6)
- (4.) Krebs oldat: T<sub>4</sub> kontroll alcsoport (n=10)
- (5.) 10  $\mu$ M NBTI: T<sub>4</sub> & NBTI alcsoport (n=8)
- (6.) 2 U/ml ADA + 10  $\mu$ M NBTI: T<sub>4</sub> & ADA+NBTI alcsoport (n=5).

A két nemzetközi egység pro ml (2 U/ml) ADA koncentrációt 10 perccel az NBTI beadása előtt hoztuk létre a szervkádakban, ezután következett az 50 perc inkubáció az NBTI-vel. Előzetes vizsgálataink alapján 2 U/ml ADA képes az exogén Ado hatását 100  $\mu$ M koncentrációig teljesen kivédeni.

### 4.3.3. A CPA-val felvett E/[A] görbe

Az *in vitro* kezelés után minden csoportban illetve alcsoportban kumulatív E/[A] görbét vettünk fel CPA-val, amely igen szelektív A<sub>1</sub> receptor agonista. Mivel

a CPA nem szubsztrátja a myocardiumban található Ado-bontó illetve újrahajtosító enzimeknek, vérmentes pitvarszövetben vizsgálatunk ideje alatt (20-40 perc) alig csökken a koncentrációja (Gesztelyi és mtsai, 2004). A CPA lassú eliminációja miatt nehezen távolítható el a pitvar szöveteiből, ezért vizsgálatunk során le kellett mondanunk az önkontrollos kísérletekről (amelyben ugyanazon preparátumon vettünk volna fel „kontroll” és „kezelt” CPA E/[A] görbét). Emiatt külön kontroll csoportot illetve kontroll alcsoportokat hoztunk létre és ezekhez hasonlítottuk a többi csoportot illetve alcsoportot.

## 4.4. Adatfeldolgozás

### 4.4.1. Beválasztási kritériumok

A pitvaroknak 3 feltételt kellett teljesíteniük, hogy bekerüljenek az elemzésbe.

(1.) A nyugalmi kontrakciós erőnek el kellett érnie az 1 mN-t az Ado E/[A] görbe előtt.

(2.) A pitvarok mechanikai aktivitásának szabályosnak kellett lennie (nem lehetett arrhythmias).

(3.) Miután kiválasztottuk az Ado E/[A] görbék EC<sub>50</sub>-éhez legközelebbi Ado koncentrációt (*in vivo* kezeletlen illetve S kezelt pitvarok esetében ez 10 μM volt, a T<sub>4</sub> kezeltéknél pedig 100 μM), az arra adott válasznak belül kellett lennie a számtani közép ± 2 SD intervallumon. A számtani közepet és a SD-t az első két feltételt teljesítő pitvarokra határoztuk meg, külön-külön az eltérő thyreoid státuszú preparátumokra.

Valamennyi pitvar adatait felhasználtuk, amelyik teljesítette a 3 beválasztási kritériumot.

### 4.4.2. A kontrakciós erők feldolgozása

Egy preparátum intakt kontrakciós erejét első E/[A] görbéjének kiindulási kontrakciós erejeként határoztuk meg. Az *in vitro* kezelés hatására kialakult

kontrakciós erőt az intakt kontrakciós erő százalékában fejeztük ki a kezeléshez használt szer inotrop hatásának jellemzésére.

#### 4.4.3. A koncentráció-hatás görbék feldolgozása

Egy  $c$  agonista koncentráció hatásának ( $E$ ) a kiindulási kontrakciós erő ( $F_0$ ) százalékos csökkenését tekintettük ( $F_c$  a kialakuló legkisebb kontrakciós erő  $c$  jelenlétében):

$$E = \frac{F_0 - F_c}{F_0} \cdot 100\%$$

A  $E/[A]$  görbék pontjaira a Langmuir-Hill egyenletet illesztettük (ld.: 2.4. Koncentrációváltozás becslése a Langmuir-Hill egyenlettel). Az egyes preparátumok válaszkészségét az adott agonistával szemben  $E/[A]$  görbéjük  $E_{\max}$ ,  $EC_{50}$  és  $n$  paramétereivel jellemeztük.

#### 4.4.4. Koncentrációbecslés a Langmuir-Hill egyenlettel (klasszikus módszer)

A Langmuir-Hill egyenletbe hatásként ( $E$ ) a kontrakciós erő DP illetve NBTI jelenlétében tapasztalt csökkenését írtuk be (a nyugalmi érték százalékában kifejezve). Az  $E_{\max}$ ,  $EC_{50}$  és  $n$  paraméterek az azonos *in vivo* kezelésű (vagy *in vivo* kezelés nélküli) pitvarok átlagolt Ado  $E/[A]$  görbéinek  $E_{\max}$ ,  $EC_{50}$  és  $n$  értékei voltak. Az így számolt  $c$  értékek azokat az Ado koncentrációkat mutatják, amelyek a szervkádba mérve azonos inotrop hatást váltanak ki, mint 10  $\mu\text{M}$  DP illetve NBTI. Az  $[Ado]_{\text{ISF}}$  változás becslésének ezt az eljárását a továbbiakban klasszikus módszernek nevezzük.

#### 4.4.5. Koncentrációbecslés a koncentráció-meghatározó egyenlet illesztésével: a „receptorial responsiveness method” (RRM)

Az  $[Ado]_{\text{ISF}}$  NT blokádnak hatására bekövetkező változását jellemző relatív mutatót ( $c_x$ ) úgy kaptunk meg, hogy a koncentráció-meghatározó egyenletet illesztettük a CPA  $E/[A]$  görbe adatokra a DP illetve NBTI kezelt csoportokban. Az

egyenlet az (azonos *in vivo* kezelésű) átlagolt kontroll CPA E/[A] görbék paramétereit tartalmazta ( $E_{max}$ ,  $EC_{50}$ ,  $n$ ), ezek definiálták a CPA és az  $A_1$  receptorok közötti intakt kapcsolatot. A kapott relatív mutató tehát azt a CPA koncentrációt adja meg, amelyik ugyanakkora inotrop hatást fejt ki, mint 10  $\mu\text{mol/l}$  DP illetve NBTI. Ezt az eljárást a továbbiakban „receptorial responsiveness method”-nak (receptorialis válaszkészség módszer), röviden RRM-nek nevezzük. Az illesztést elvégeztük mind az individuális, mind az átlagolt CPA E/[A] görbe adatokra.

Annak érdekében, hogy a klasszikus módszerrel számított Ado koncentrációkat összehasonlíthassuk az RRM becsléseivel, az RRM által szolgáltatott CPA koncentrációkat a Langmuir-Hill egyenlettel átszámoltuk Ado koncentrációkra. Először a  $c_x$  értékekhez tartozó negatív inotrop hatásokat ( $E_x$ ) számoltuk ki a Langmuir-Hill egyenlettel, amelybe az (azonos *in vivo* kezelésű) átlagolt kontroll CPA E/[A] görbe  $E_{max}$ ,  $EC_{50}$  és  $n$  paramétereit írtuk. Ezután az  $E_x$ -ekhez tartozó Ado koncentrációkat számoltuk ki a Langmuir-Hill egyenlettel, amely az (azonos *in vivo* kezelésű) átlagolt kontroll Ado E/[A] görbe  $E_{max}$ ,  $EC_{50}$  és  $n$  paramétereit tartalmazta. Mivel a számításhoz Ado E/[A] görbék paramétereit használtuk fel, az így kapott Ado koncentrációk - a klasszikus módszerrel számítottakhoz hasonlóan - azokat az Ado koncentrációkat adják meg, amelyek a szervkádba mérve azonos inotrop hatásúak 10  $\mu\text{M}$  DP-lal illetve NBTI-vel.

#### 4.4.6. Statisztikai feldolgozás

Normál eloszlást és homogén varianciákat mutató adathalmazok (csoportok) középértékeinek összehasonlításához két csoport esetén kétoldalú kétmintás párosítatlant Student-féle  $t$  tesztet végeztünk, kettőnél több csoportra egyutas varianciaanalízist (ANOVA) készítettünk Newman-Keuls poszt-tesztel. Ha két normál eloszlású csoport varianciái különbözőek voltak, Welch-korrigált  $t$  tesztet használtunk. Nem normál eloszlást mutató két csoportot Mann-Whitney  $U$  tesztel, többet Kruskal-Wallis tesztel hasonlítottunk össze, utóbbit Dunn poszt-tesztel kiegészítve.

E/[A] görbék esetében az összehasonlítás tárgyai az  $E_{max}$ , a  $\log EC_{50}$  és az  $n$  értékek voltak. Az  $EC_{50}$  logaritmálására azért volt szükség, hogy az adatok

normál eloszlásúvá váljanak és (ha megfelelnek minden fent részletezett feltételnek) parametrikus statisztikai próbával vizsgálhatók legyenek.

A számított Ado és CPA koncentrációk esetében kétféle átlagot képeztük: **(1.)** vettük az individuális koncentrációk számtani közepét; **(2.)** először vettük az alapadatok számtani közepét és azokból számoltunk koncentrációt. A statisztikai elemzés során az individuális koncentrációk átlagát hasonlítottuk össze, az átlagolt alapadatokból nyert koncentrációkat pedig illusztrációként használtuk, mivel az előzetes átlagolás ellensúlyozza a biológiai variabilitás és a mérési hibák zavaró hatását.

A klasszikus módszerrel és az RRM-mel számolt Ado koncentrációkat kétutas ANOVA-val is összehasonlítottuk.

A véletlen oki szerepét  $p < 0.05$  esetén vetettük el.

## 5. Eredmények

### 5.1. A tiroxinkezelés hatása a tengerimalacokra

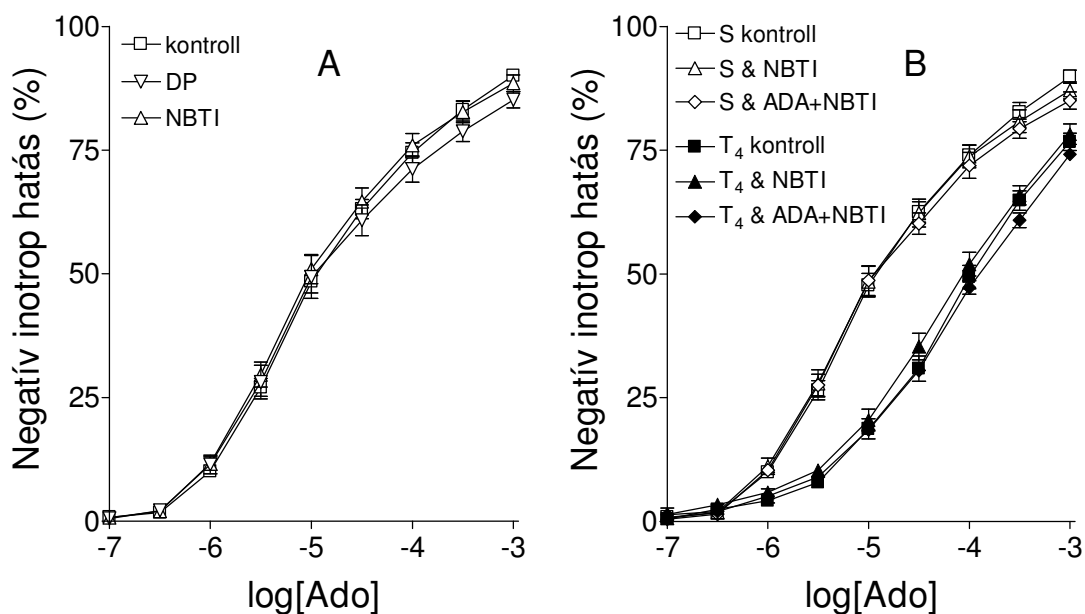
A T<sub>4</sub> kezelt állatok a 9. napra elvesztették kiindulási testtömegük kb. negyedét (fogyás 594 ± 24 g-ról 492 ± 18 g-ra; p<0.0001), rectalis hőmérsékletük pedig átlagosan 0.9 °C-ot emelkedett (37.3 ± 0.1 °C-ról 38.2 ± 0.2 °C-ra; p<0.0001). Az S kezelt csoportban a testtömeg és a hőmérséklet nem változott szignifikánsan (588 ± 19 g-ról 570 ± 20 g-ra; 37.2 ± 0.1 °C-ról 37.5 ± 0.2 °C-ra).

### 5.2. Az adozinra adott inotrop válasz

Az Ado koncentrációfüggően csökkentette mind az eu-, mind a hyperthyreoid pitvarok kontrakciós erejét.

Az *in vivo* kezeletlen csoportok illetve az azonos *in vivo* kezelésű alcsoportok Ado-ra adott válasza nem különbözött szignifikánsan egymástól a jelen értekezésben feldolgozott két vizsgálat egyikében sem. Ez a csoportosítás megfelelő randomizációját mutatja (5. A, B ábra).

A T<sub>4</sub> kezelés nem befolyásolta szignifikánsan az Ado E/[A] görbék E<sub>max</sub>-át (92.4 ± 3.1 %), viszont szignifikánsan növelte az EC<sub>50</sub>-et (114.5 ± 28.4 μM; p<0.0001) és csökkentette a Hill koefficiens (0.69 ± 0.02; p<0.0001), a megfelelő S kezelt paraméterekkel összehasonlítva (86.6 ± 1.1 %; 9.8 ± 0.7 μM; 0.84 ± 0.02) (5. B ábra).



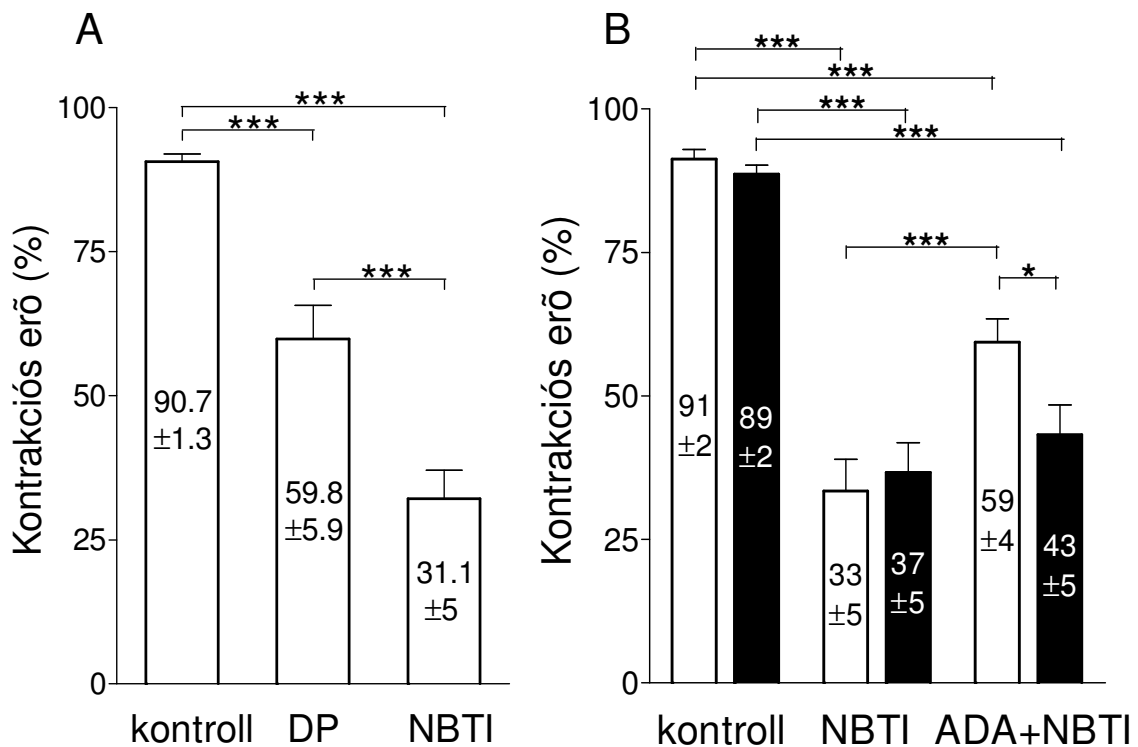
**5. ábra.** Az Ado-ra adott inotrop válasz az *in vivo* kezeletlen csoportokban (**A**) és az *in vivo* S illetve  $T_4$  kezelt alcsoportokban (**B**), még az *in vitro* kezelés előtt. Az x tengelyen az Ado koncentráció tízes alapú logaritmusát vettük fel, az y tengelyen pedig a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenését. A szimbólumok a  $E/[A]$  görbe adatok számtani közepét ( $\pm$  SEM) mutatják. A világos szimbólumok az euthyreoid, a sötét szimbólumok pedig a hyperthyreoid pitvarokat jelzik.

### 5.3. A nukleozid transzport gátlás hatása a nyugalmi kontrakciós erőre

Az intakt kontrakciós erők az egyes csoportok és alcsoportok között sehol sem különböztek szignifikánsan az *in vitro* kezelés előtt (igazolva a megfelelő randomizációt). Az átlagos erők ( $\pm$  SEM) az *in vitro* kezeletlen, az S és a  $T_4$  kezelt csoportban a következők voltak:  $6.9 \pm 0.4$  mN,  $6.7 \pm 0.3$  mN és  $6.4 \pm 0.3$  mN (az említés sorrendjében).

Az *in vitro* kezelés során a kontroll pitvarok nyugalmi kontrakciós ereje csak kismértékben csökkent, a DP közepes gyengülést okozott, míg az NBTI nagymértékűt, a kontrakciós erő kb. 2/3-a veszett el (6. A, B ábra). ADA jelenléte gátolta az NBTI hatását, ez azonban csak az euthyreoid alcsoportok között volt szignifikáns (6. B ábra).





**6. ábra.** Az *in vitro* kezelés hatása a kontrakciós erőre az *in vivo* kezeletlen csoportokban (A) és az *in vivo* S illetve T<sub>4</sub> kezelt alcsoportokban (B). Az x tengelyen tüntettük fel a csoportokat illetve alcsoportokat, az y tengelyen pedig a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenését. A világos oszlopok az euthyreoid, a sötét oszlopok pedig a hyperthyreoid pitvarokat reprezentálják (+ SEM). A számtani közép (± SEM) az oszlopok belsejében van feltüntetve. A csoportátlagok különbségének szignifikancia-szintje az oszlopok fölött látható: p<0.05 (\*) és p<0.001 (\*\*\*)

#### 5.4. A nukleozid transzport gátlás hatása a CPA-ra adott inotrop válaszra

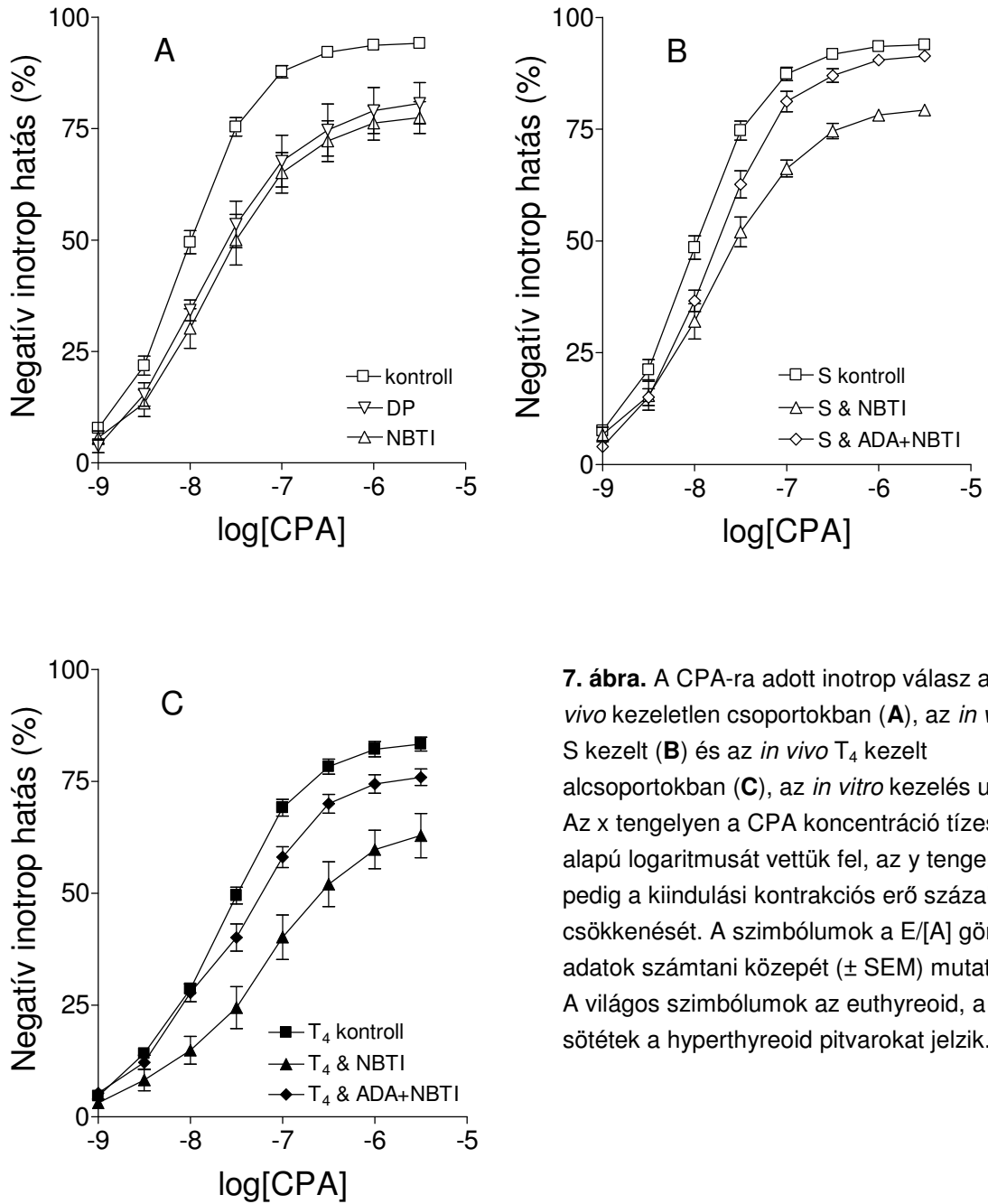
Az Ado-hoz hasonlóan a CPA is koncentrációfüggően gyengítette mind az eu-, mind a hyperthyreoid pitvarok kontrakciós erejét (7. A, B, C ábra).

A T<sub>4</sub> kezelt kontroll pitvarokon a CPA-ra adott inotrop válasz szignifikánsan kisebb volt, mint az S kezelt kontrollokon (3. S+T<sub>4</sub> táblázat).

Az *in vivo* kezeletlen pitvarokon a DP és az NBTI szignifikánsan és hasonló mértékben csökkentette a CPA-ra adott választ (7. A ábra; 3. Ø táblázat).

A T<sub>4</sub> kezelt pitvarokon az NBTI erőteljesebben csökkentette a CPA-ra adott választ, mint az S kezeltéken. Az ADA szignifikánsan mérsékelte az NBTI hatását

mind az eu-, mind a hyperthyreoid preparátumokon (7. B, C ábra; 3. S+T<sub>4</sub> táblázat).



**7. ábra.** A CPA-ra adott inotrop válasz az *in vivo* kezeletlen csoportokban (**A**), az *in vivo* S kezelt alcsoportokban (**B**) és az *in vivo* T<sub>4</sub> kezelt alcsoportokban (**C**), az *in vitro* kezelés után. Az x tengelyen a CPA koncentráció tízes alapú logaritmusát vettük fel, az y tengelyen pedig a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenését. A szimbólumok a E/[A] görbe adatok számtani közepét ( $\pm$  SEM) mutatják. A világos szimbólumok az euthyreoid, a sötétek a hyperthyreoid pitvarokat jelzik.

$\emptyset$	Kontroll (n=11)	DP (n=9)	NBTI (n=10)
$E_{max}$ (%)	94.1 ± 0.9	83.3 ± 4.1 *	77.6 ± 3.7 ***
$EC_{50}$ (nM)	9.1 (7.3 - 11.3)	14.3 (9.8 - 20.9)	17.5 (10.5 - 29.3) *
n	1.14 ± 0.03	0.98 ± 0.09	1.04 ± 0.08

$S+T_4$	S kezelt pitvarok			$T_4$ kezelt pitvarok		
	Kontroll (n=10)	NBTI (n=8)	ADA+NBTI (n=6)	Kontroll (n=10)	NBTI (n=8)	ADA+NBTI (n=5)
$E_{max}$ (%)	93.9 ± 1	79.8 ± 0.6 ###	91.4 ± 1.3 +++	84.7 ± 1.7 ***	66.2 ± 4.8 ###	78.8 ± 1.9 ‡
$EC_{50}$ (nM)	9.4 (7.5 - 11.8)	15.5 (9.6 - 25.2) ≠	15 (11.4 - 19.6) †	20.9 (18.6 - 23.5) ***	59.3 (36.6 - 95.9) ###	26.4 (16.5 - 42.4) ‡
n	1.14 ± 0.03	0.95 ± 0.07 ≠	1.07 ± 0.03	0.91 ± 0.02 ***	0.85 ± 0.11	0.78 ± 0.03

**3. táblázat.** Az individuális CPA E/[A] görbék paraméterei, melyeket a Langmuir-Hill egyenlet illesztésével nyertünk. Az  $E_{max}$  és n számtani közép ± SEM formában került megadásra, míg az  $EC_{50}$  mértani középpel és annak 95%-os konfidencia intervallumával (mivel statisztikailag a  $\log EC_{50}$ -et vizsgáltuk). A statisztikailag szignifikáns különbségeket a számok alatt jeleztük ( $p < 0.05$  - egy szimbólum;  $p < 0.001$  - három szimbólum).

A  $\emptyset$  táblázatban a DP és NBTI kezelt csoportok közötti különbség egyik paraméter esetén sem volt szignifikáns, a csillagok a kontrolltól való eltérés szignifikancia-szintjét mutatják.

Az  $S+T_4$  táblázatban az alábbi alcsoportok összehasonlításának eredményét tüntettük fel:  $T_4$  kontroll - S kontroll (\*); S & NBTI - S kontroll, valamint  $T_4$  & NBTI -  $T_4$  kontroll (≠); S & ADA+NBTI - S kontroll, valamint  $T_4$  & ADA+NBTI -  $T_4$  kontroll (†); S & ADA+NBTI - S & NBTI, valamint  $T_4$  & ADA+NBTI -  $T_4$  & NBTI (‡).

## 5.5. A nukleozid transzport gátlás hatása a myocardialis $A_1$ receptorok környezetének adozin koncentrációjára

Az  $[Ado]_{ISF}$  *in vitro* kezelés hatására bekövetkező változásának jellemzésére két eljárást alkalmaztunk, a klasszikus módszert és az RRM-et. Előbbit csak az *in vivo* kezeletlen pitvarokon kiviteleztük abból a célból, hogy a kapott eredményeket az RRM eredményeivel összehasonlíthassuk, míg az RRM-et alkalmaztuk az *in vivo* S és  $T_4$  kezelt pitvarokon is.

A klasszikus módszer alapján az *in vitro* kezelés inotrop hatásából számoltuk ki azt az Ado koncentrációt, amely a szervkádba mérve ekviekvált lenne. Az RRM során CPA-val kétféle E/[A] görbét vettünk fel: kontrollt, amihez hasonlítottunk, és azt, aminek a kontrolltól való eltérését egy CPA koncentrációval ( $c_x$ ) jellemeztük. Ez úgy történt, hogy a kontroll CPA E/[A] görbe paramétereit ( $E_{max}$ ,  $EC_{50}$ ,  $n$ ) beírtuk a koncentráció-meghatározó egyenletbe, amelyet aztán a torzult CPA E/[A] görbe adataira illesztettünk. A következő illesztéseket végeztük el:

(1.) a kontroll csoport átlagolt CPA E/[A] görbéjének paramétereivel **a**) a DP és az NBTI csoportok átlagolt CPA E/[A] görbe adataira (8. A ábra, 4. Ø táblázat), valamint **b**) a DP és az NBTI csoportok individuális CPA E/[A] görbe adataira (4. Ø táblázat);

(2.) az S kontroll alcsoport átlagolt CPA E/[A] görbéjének paramétereivel **a**) az S & NBTI és az S & ADA+NBTI alcsoportok átlagolt CPA E/[A] görbe adataira (8. B ábra, 4. S táblázat), valamint **b**) az S & NBTI és az S & ADA+NBTI alcsoportok individuális CPA E/[A] görbe adataira (4. S táblázat);

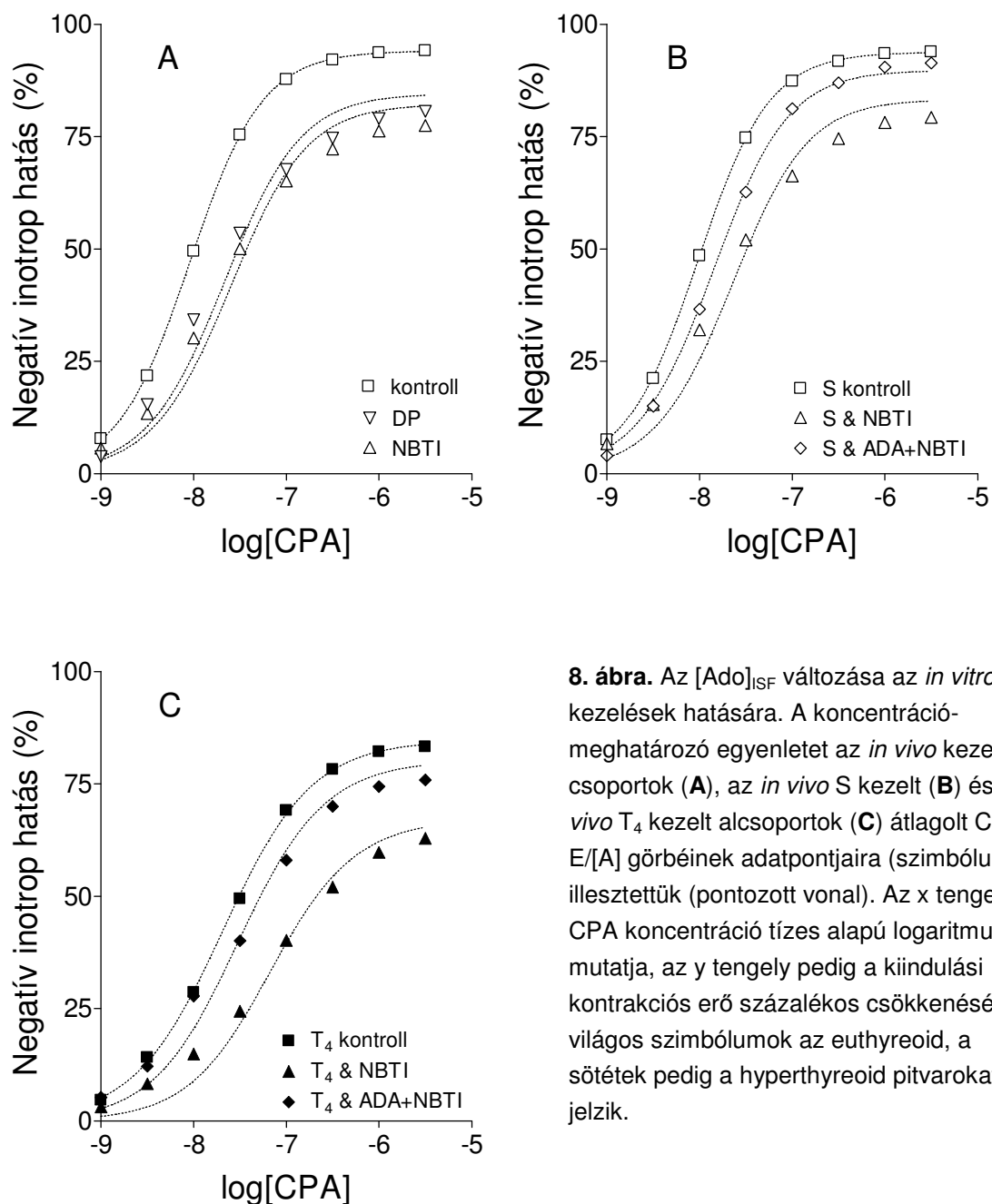
(3.) a  $T_4$  kontroll alcsoport átlagolt CPA E/[A] görbéjének paramétereivel **a**) a  $T_4$  & NBTI és a  $T_4$  & ADA+NBTI alcsoportok átlagolt CPA E/[A] görbe adataira (8. C ábra, 4.  $T_4$  táblázat), valamint **b**) a  $T_4$  & NBTI és a  $T_4$  & ADA+NBTI alcsoportok individuális CPA E/[A] görbe adataira (4.  $T_4$  táblázat).

Jóllehet az *in vivo* kezeletlen pitvarokon nem volt statisztikailag szignifikáns differencia az eltérő módszerrel kapott eredmények között, a különbség figyelemre méltóan nagyobb volt a DP csoportban (4. Ø táblázat: Átlag 1 értékek).

Szignifikáns különbség mutatkozott viszont az eltérő *in vitro* kezelésű csoportok azon Ado koncentrációi között, amelyeket a klasszikus módszerrel kaptunk ( $p < 0.01$ ) (4. Ø táblázat: Átlag 1 értékek). Az eltérés oka (source of variation) a kétutas ANOVA szerint a két NT inhibitor közötti különbség ( $p = 0.034$ ) és nem a módszerek különbsége ( $p = 0.88$ ).

Az *in vivo* kezelt pitvarok esetében a  $T_4$  & NBTI alcsoport  $c_x$  koncentrációinak átlaga 2.5-szerese volt az S & NBTI alcsoportbeli  $c_x$  koncentrációk átlagának ( $p < 0.05$ ) (4. S és  $T_4$  táblázatok: Átlag 1 értékek). Ezzel összhangban alakultak az átlagolt CPA E/[A] görbékkel meghatározott  $c_x$  koncentrációk is: a  $T_4$  & NBTI alcsoportban meghatározott  $c_x$  másfélszerese volt az S & NBTI alcsoport  $c_x$  értékének (4. S és  $T_4$  táblázatok: Átlag 2 értékek).

Amennyiben NBTI mellett egyidejűleg ADA is jelen volt, a kapott  $c_x$  értékek lényegesen kisebbek voltak (4. S és  $T_4$  táblázatok: Átlag 1 és Átlag 2 értékek), bár ez csak a  $T_4$  kezelt pitvarok esetében volt statisztikailag szignifikáns ( $p < 0.05$ ) (4. S és  $T_4$  táblázatok: Átlag 1 értékek).



**8. ábra.** Az  $[Ado]_{ISF}$  változása az *in vitro* kezelések hatására. A koncentráció-meghatározó egyenletet az *in vivo* kezeletlen csoportok (A), az *in vivo* S kezelt (B) és az *in vivo*  $T_4$  kezelt alcsoportok (C) átlagolt CPA  $E/[A]$  görbéinek adatpontjaira (szimbólumok) illesztettük (pontosított vonal). Az x tengely a CPA koncentráció tízes alapú logaritmusát mutatja, az y tengely pedig a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenését. A világos szimbólumok az euthyreoid, a sötétek pedig a hyperthyreoid pitvarokat jelzik.

A kontroll csoport (4. Ø táblázat) és a kontroll alcsoportok (4. S és  $T_4$  táblázat) esetében az RRM-mel való koncentrációbecslés ellenőrző céllal történt. Mivel a kontroll pitvarok CPA  $E/[A]$  görbéinek  $E_{max}$ ,  $EC_{50}$  és n paramétereit

definiálták a bazális  $[Ado]_{ISF}$ -t az  $[Ado]_{ISF}$  változását jellemző RRM számára, a kontroll pitvarokon a módszernek elvben zéró változást kell becsülnie. Esetünkben a kontrollokon meghatározott  $c_x$  értékek általában több nagyságrenddel kisebbnek adódtak, mint a NT gátló jelenlétében kaptak, ami elfogadható pontosságot jelent.

$\emptyset$	Kontroll	DP		NBTI	
	Átlag 2	Átlag 1	Átlag 2	Átlag 1	Átlag 2
RRM [CPA] (nM)	0.035	16.2 ± 3.7	16.1	25.3 ± 9.2	20.4
RRM [Ado] (μM)	0.005	32.3 ± 12.5	25.5	58 ± 28.6	36.9
K [Ado] (μM)	-	9.8 ± 3.7	7.5	87.6 ± 31.8 **	40

S	Kontroll	NBTI		ADA+NBTI	
	Átlag 2	Átlag 1	Átlag 2	Átlag 1	Átlag 2
RRM [CPA] (nM)	0.7	18.8 ± 3	18.5	7.9 ± 1.9	7.8

T <sub>4</sub>	Kontroll	NBTI		ADA+NBTI	
	Átlag 2	Átlag 1	Átlag 2	Átlag 1	Átlag 2
RRM [CPA] (nM)	0.0009	46.5 ± 13.7 †	37	7.4 ± 2.3 ≠	6.6

**4. táblázat.** Az A<sub>1</sub> receptorközei  $[Ado]_{ISF}$  változását jellemző, RRM-mel meghatározott CPA koncentrációk ( $c_x$ ); a  $c_x$ -ekből a Langmuir-Hill egyenlettel számított Ado koncentrációk; valamint a klasszikus módszerrel számolt Ado koncentrációk. A vizsgált csoportok és alcsoportok *in vivo* kezelését a táblázatok bal felső sarkában jeleztük ( $\emptyset$ , S, T<sub>4</sub>), az *in vitro* kezelés jellegét pedig a táblázatok felső sorának többi részében tüntettük fel.

Az „RRM [CPA] (nM)” kezdetű sorok az  $[Ado]_{ISF}$  változásával ekvielektív CPA koncentrációkat ( $c_x$ ) tartalmazzák (nM-ban), míg az ezekből a Langmuir-Hill egyenlettel átszámított Ado-szinteket az „RRM [Ado] (μM)” kezdetű sorok adják meg (μM-ban). A „K [Ado] (μM)” kezdetű sor a klasszikus módszerrel meghatározott Ado koncentrációkat mutatja (μM-ban). Átlag 1: a meghatározott individuális értékek számtani közepe ± SEM. Átlag 2: az előzetesen átlagolt kiindulási adatokból meghatározott értékek (az RRM esetében ld.: 8. ábra).

A statisztikai szignifikancia-szintek a következő összehasonlításokra vonatkoznak: az NBTI és a DP csoportok azonos koncentrációbecslő módszeren belül (\*); az S és a T<sub>4</sub> kezelt alcsoportok azonos *in vitro* kezelésen belül (†); az NBTI és az ADA+NBTI alcsoportok azonos *in vivo* kezelésen belül (≠). Egy szimbólum: p<0.05 ; két szimbólum: p<0.01 .

## 6. Megbeszélés

A szív Ado receptorai közül legtöbbet kutatott  $A_1$  receptorok jellegzetessége, hogy nagy dózisú teljes agonista jelenlétében is csak lassan deszenzitizálódnak (Longabaugh és mtsai, 1989; Baker és mtsai, 2000). Mi több, veleszületetten ADA deficiens egerekben (amelyek a kísérleteket megelőző két hétig pegilált ADA szubsztitúcióban részesültek, melynek felezési ideje kb. négy nap) az emelkedett szöveti Ado-szint ellenére a vad típusra jellemző  $A_1$  és  $A_{2A}$  receptor-érzékenységet tapasztaltak (Willems és mtsai, 2006). Ez arra utal, hogy az Ado receptorok számára hozzáférhető agonisták koncentrációjának akár tartós megváltoztatása is hosszantartóan képes az Ado receptorok, köztük az  $A_1$  receptorok működésére hatni, ami perspektívát ad az adenzinerg agonisták és érzékenyítők (sensitizerek), illetve az Ado szöveti eloszlását befolyásoló szerek további kutatásának.

Az interstitium Ado kínálatának jelentősége a szívizom ischaemiával szembeni védekezőképessége szempontjából egyre nagyobb a folyamatosan halmozódó evidenciák tükrében (összefoglalóként ld.: Peart és Headrick, 2007). Megfelelő oxigén- és tápanyagellátás esetén az  $[Ado]_{ISF}$  növekedését okozó NT gátlók fokozzák az Ado kardioprotektív hatását (összefoglalóként ld.: Deussen, 2000a, 2000b; De Jong és mtsai, 2000), ugyanakkor ischaemiában a NT inhibitorok tovább rontják a szív állapotát, mivel gátolják az Ado kijutását a sejtekből (Schrieck és Richardt, 1999). Az extracelluláris Ado termelésében kulcsszerepet játszó ekto-5'-nukleotidáz farmakológiai vagy génszintű gátlása pedig egyenesen felfüggeszti az ischaemiás prekondicionálás kardioprotektív hatását (Eckle és mtsai, 2007).

Az interstitialis Ado elsősorban sejtfelszíni Ado receptorok ingerlése révén fejt védő hatását. Az Ado receptorok közül napjainkra a legtöbb bizonyíték az  $A_1$  receptorok kardioprotektív funkcióját támasztja alá, de kimutatták más altípusok részvételét is, noha a pontos mechanizmus a mérési korlátok és az egymásnak részben ellentmondó eredmények miatt még nem tisztázott (Peart és Headrick, 2007).

## 6.1. Új lehetőségek keresése az interstitialis adenzin koncentrációjának meghatározására

A cardialis  $[Ado]_{ISF}$  becslésére jelenleg elfogadott módszerek vagy valamilyen interstitiumból vett folyadékminta Ado-tartalmának, vagy az Ado artériás és coronaria-vénás koncentrációkülönbségének mérésén alapulnak. A kapott értékek skálája három nagyságrendre terjed ki erősen függve az alkalmazott mérőmódszertől (1. táblázat), ami új eljárás kidolgozásának szükségességét mutatja. Különösen informatív lenne az  $[Ado]_{ISF}$  ismerete a sejtfelszíni  $A_1$  receptorok közelében, mivel ezek aktivitása fontos szerepet tölt be a szív ischaemiával és hypoxiával szembeni védekezésében.

Régóta ismert, hogy jól oxigenált szívizomban a NT gátlása fokozza mind az endogén, mind az exogén Ado hatásait (Szentmiklósi és mtsai, 1982; Van Belle, 1993; De Jong és mtsai, 2000; Gesztelyi és mtsai, 2003a). A direkt  $[Ado]_{ISF}$  mérés nagyfokú módszerfüggése miatt (1. táblázat) a NT gátlók hatása is nehezen ítélni meg (2. táblázat), különösen a myocardialis  $A_1$  receptorok környezetében, ami működő szívben nehezen megközelíthető szöveti kompartment.

### 6.1.1. A Langmuir-Hill egyenlet használhatósága

A Langmuir-Hill egyenlet kapcsolatot teremt a két anyag specifikus kötődését igénylő hatás és a kötődés egyik résztvevőjének koncentrációja között, ezért első megközelítésben alkalmasnak látszott agonisták koncentrációjának (pontosabban annak egy alapértékhez képesti változásának) becslésére a hatás alapján. Ehhez szükség van a koncentráció és a hatás kapcsolatát jellemző állandók ismeretére. Ha egy adott agonistával egy adott szövet típuson  $E/[A]$  görbét veszünk fel, majd annak adataira a Langmuir-Hill egyenletet illesztjük, három paraméter, az  $E_{max}$ , az  $EC_{50}$  és az  $n$  fogja kvantifikálni a koncentráció és a hatás közötti kapcsolatot. Amennyiben ezek a paraméterek rendelkezésre állnak, az agonista adott szövetben kifejtett hatásából algebrai úton kiszámolható az agonista koncentrációváltozása ahhoz a szinthez képest, ami az  $E_{max}$ ,  $EC_{50}$  és  $n$  értékeket szolgáltató (kontroll)  $E/[A]$  görbe felvételekor a kiindulási állapotot jellemezte (ld.: 2.4. Koncentrációváltozás becslése a Langmuir-Hill egyenlettel). Az



így kiszámolt koncentráció(változás) egyedisége abban rejlik, hogy a receptorok mikrokörnyezetére vonatkozik, vagyis más vizsgálómódszer számára nehezen hozzáférhető szöveti kompartmentet jellemez. A receptorközeli koncentráció mind endogén regulátorok, mind különböző farmakonok esetén biológiailag nagyon informatív adat.

Amennyiben koncentráció(változás)t a Langmuir-Hill egyenlettel kívánunk meghatározni (ez, tekintve az egyenlet 1909-es első leírását, joggal nevezhető klasszikus módszernek), az eljárás sarkalatos pontja az intakt  $E/[A]$  kapcsolat kvantifikálása. Ehhez egy kontroll  $E/[A]$  görbét kell lege artis felvenni az adott agonistával az adott szövettípuson.  $E/[A]$  görbe felvételekor a hatást általában ahhoz a koncentrációhoz rendeljük, melyet a beadott dóziséból és a megoszlási térből számolunk ki, vagy esetleg ahhoz, amelyet egyidejűleg egy könnyen hozzáférhető másik kompartmentben mérünk feltételezve az egyenletes eloszlást. A klasszikus módszerrel történő koncentrációbecslés tehát posztulálja, hogy a receptor környezetében akkora a hatóanyag koncentrációja, mint amekkorát kiszámoltunk vagy egy másik kompartmentben (pl. perfuzátumban, vérplazmában) mértünk.

Ha a vizsgált agonista eloszlása nem egyenletes, mert pl. el nem hanyagolható mértékben transzportálódik és bomlik az adott szövetben, a klasszikus módszerrel meghatározott koncentráció jelentősen eltérhet az agonista receptorközeli koncentrációjától. Ilyenkor az agonista koncentrációját a klasszikus módszer túlbecsüli, ugyanis az észlelt hatáshoz nem a tényleges receptorközeli koncentrációt rendeljük, ami kisebb, hanem azt, amelynek a kiszámítás vagy mérés alapjául szolgáló kompartmentben (pl. szervfürdő, perfuzátum, vérplazma) jelen kell lennie ahhoz, hogy a receptorok kompartmentjében kialakulhasson az észlelt hatást kiváltani képes koncentráció.

Mivel az Ado igen gyorsan metabolizálódik (pl. humán vérben féléletideje 0.6 - 10 s; összefoglalóként ld.: Fazekas, 1999),  $E/[A]$  görbe felvétele során koncentrációja csak egy szervkád szövetmentes tápoldatában tekinthető ismertnek, de ez nem egyezik meg receptorközeli koncentrációjával. Az exogén Ado gyors eliminációját a szívizomban elsősorban a sejtek erőteljes Ado felvétele okozza, amely döntően ekvibratív és NBTI-szenzitív nukleozid transzportereken (ENT1) keresztül zajlik. A befelé irányuló transzportot az intracelluláris tér jelentős Ado-bontó és újrahasznosító kapacitása tartja fenn (összefoglalóként ld.:

Deussen, 2000a, 2000b). Az  $[Ado]_{ISF}$  direkt méréséből származó adatokat szintén érdemes óvatosan kezelni. Az irodalmi adatok (egy specieszen és egy szövettípuson belül is) három nagyságrendet felölelő szórást mutatnak (1. táblázat), ami kétségessé teszi ezen  $[Ado]_{ISF}$  értékek használhatóságát. Megállapíthatjuk tehát, hogy Ado  $E/[A]$  görbe adatokon alapuló módszer nem alkalmas az  $[Ado]_{ISF}$  változásának meghatározására.

Felmerül, mennyire megbízható az  $[Ado]_{ISF}$  bazális értékhez képesti változásának klasszikus módszerrel számolt relatív mutatója. Mivel ez az érték erősen függ a vizsgált szövet Ado-ra specifikus enzimeinek és transzportereinek működésétől, a klasszikus módszer nem alkalmas olyan szövetek közötti összehasonlításra, amelyekben ezek az enzimek illetve carrierek eltérő aktivitásúak. Ismert, hogy hyperthyreota szívben nagyobb a NT maximális kapacitása, fokozott továbbá az intracelluláris Ado újrahasonosításáért felelős Ado kináz aktivitása, valamint csökkent az intracelluláris Ado bontásban résztvevő ADA aktivitása (Smolenski és mtsai, 1995). Hyperthyreoid szívben emelkedett az ekto-5'-nukleotidáz aktivitása is, amely az extracelluláris Ado termelésének kulcsenzime (Carneiro-Ramos és mtsai, 2004). Következésképp, amennyiben eu- és hyperthyreoid szívizom  $[Ado]_{ISF}$  változását kívánjuk összehasonlítani NT gátló jelenlétében, más módszerhez kell folyamodnunk.

### **6.1.2. Az RRM lehetőségei és korlátai**

Ha egy agonista dózisait ismételten mérjük be, de kiindulási állapotnak mindig az aktuális dózis beadása előtti állapotot vesszük (vagyis sem a korábbi dózisokat, sem az általuk kialakított hatást nem vesszük figyelembe), egyre kisebb válaszokat regisztrálhatunk. Ez a csökkenő válaszkészség az aktuális dózisokkal szemben azért alakul ki, mert a korábbi dózisok a receptorok egy részének lefoglalása és azokon hatás létrehozása révén „elhasználják” a receptorhordozó struktúra funkcionális kapacitásának (válaszkészségének) egy részét, így az aktuális dózis kisebb receptorpopulációhoz kötődhet és kisebb funkcionális kapacitás áll a rendelkezésére (ld.: 12.1. Egymást követő agonista-dózisok hatásának megjelenése a receptorfunkcióban).

A regisztrált jelenség emlékeztet a receptorális deszenzitizációra, de attól teljesen független. Deszenzitizáció esetén a receptor (és/vagy a hozzá tartozó

jelátviteli út) megváltozása miatt a nyugalmi állapotú (nem ingerelt) receptorhoz adott agonista-dózis csökkent választ hoz létre. Az előző bekezdésben leírt elrendezésben csak mi mérünk csökkent választ, mivel nem vesszük figyelembe sem a már korábról jelenlévő agonista koncentrációt, sem annak hatását. Vagyis, olyan receptorokon mérünk csökkent választ, amelyek nyugalmi állapotukban egy agonista-dózisra normális nagyságú választ adnának.

Egy aktuális agonista-dózisra adott válasz csökkenése függ a már korábról beadott dózis(ok) által a receptorok környezetében létrehozott agonista koncentrációtól. Ez lehetőséget teremt arra, hogy egy receptora közelében ismeretlen mennyiségben felhalmozódott agonista koncentrációját a receptorok válaszkésztségének csökkenésével jellemezzük. A jellemzés pontosabbá és megbízhatóbbá tehető, ha  $E/[A]$  görbét veszünk fel az adott agonistával a szövet natív állapotában illetve a meghatározandó koncentráció jelenlétében, majd összehasonlítjuk a kapott görbét. Ennek egy egyszerű módja, ha a meghatározandó koncentráció jelenlétében felvett  $E/[A]$  görbére a natív („kontroll”)  $E/[A]$  görbe paramétereit tartalmazó koncentráció-meghatározó egyenletet illesztjük (ld.: 2.5. Koncentrációváltozás becslése koncentráció-hatás görbe regresszióanalízisével). A görbeillesztés eredménye (a regressziós paraméter) a meghatározandó koncentrációra tett becslés lesz. Ezt a mérőmódszert elve alapján receptorális válaszkésztség módszernek („receptorial responsiveness method”; RRM) neveztük el. Egy izolált tengerimalac bal pitvaron a közelmúltban végzett vizsgálat során az előzetesen ismert koncentrációban bemért CPA-t figyelemre méltó pontossággal kvantifikálták CPA  $E/[A]$  görbék segítségével, a becslések a tényleges értékek körül kevesebb, mint fél nagyságrenden belül szórtak (Gesztelyi és mtsai, 2004).

A meghatározás pontosságát több körülmény is befolyásolja.

(1.) A receptorális hatásnak jól mérhetőnek kell lennie, továbbá a használt agonista natív  $E/[A]$  görbéjének (pontosabban: szemilogaritmikus ábrázolás mellett a két görbület közé eső kvázi lineáris szakasznak) lehetőleg minél szélesebb koncentráció-tartományt kell átfognia. Mivel az  $A_1$  receptor robusztus és könnyen mérhető negatív inotrop hatást hoz létre szívizmon, a kontrakciós erő detektálása alkalmas az  $A_1$  receptorfunkció vizsgálatára (Gesztelyi és mtsai, 2003a, 2003b, 2004). A pitvarszövet különösen megfelel ennek a célnak, ugyanis, szemben a kamrával, pitvaron az  $A_1$  receptor agonisták előzetes AC aktiváció

nélkül is erőteljesen csökkentik a kontrakciós erőt (Kurachi és mtsai, 1986; összefoglalóként ld.: Belardinelli és mtsai, 1995).

(2.) Fontos, hogy a meghatározandó koncentráció ne változzon lényegesen a  $E/[A]$  görbe felvételének ideje alatt. A NT gátlás  $[Ado]_{ISF}$ -ra kifejtett hatásának vizsgálata esetén ez úgy biztosítható, hogy kivárujuk az új egyensúly beállítását (amit jelen vizsgálataink során a kontrakciós erő stabilizálódása jelzett).

(3.) Ha a felhalmozódott agonista hosszú ideig tartózkodik receptora környezetében, akkor a receptoron valódi deszenzitizációt hozhat létre. Ez a tény a meghatározás lehetőségét általánosságban az akut koncentrációváltozásokra szűkíti le. Mivel az  $A_1$  receptorok hosszabb (órákig, sőt napokig tartó) stimuláció mellett sem deszenzitizálódnak lényeges mértékben (Longabaugh és mtsai, 1989; Baker és mtsai, 2000), az  $A_1$  receptor agonisták jól vizsgálhatók az RRM-mel.

(4.) Problémát jelent az is, ha a meghatározandó agonista könnyen bomlik. Az  $A_1$  receptor endogén ligandja, az Ado több erősen kompartmentalizált enzim illetve egy jelentős aktivitású transzporter szubsztrátja, ezért maga is erősen kompartmentalizálódik, vagyis eloszlása nem tekinthető homogénnek a szívben (összefoglalóként ld.: Deussen, 2000a, 2000b; Sommerschild és Kirkebøen, 2000; Headrick és mtsai, 2003). Ezek a tényezők alapvetően befolyásolják az exogén Ado eloszlását is, így élő szöveten, különösen működő szívizomban, Ado  $E/[A]$  görbe felvételekor az Ado hatását nehéz a releváns Ado koncentrációhoz rendelni (ld.: 6.1.1. A Langmuir-Hill egyenlet használhatósága). Az Ado gyors metabolizmusa és kompartmentalizációja ugyanakkor nem okoz problémát abban az esetben, ha két dinamikus egyensúlyi állapot összehasonlítása a cél. Elvi problémát jelent viszont az, hogy az Ado  $E/[A]$  görbe nem a receptorközeli Ado koncentrációra vonatkozik, így az RRM sem azt fogja megadni, ha a  $E/[A]$  görbékét Ado-nal vesszük fel. Ennek megfelelően (a klasszikus módszerhez hasonlóan) az RRM sem alkalmas arra, hogy az  $[Ado]_{ISF}$  változására megbízható becslést tegyen.

A fennmaradó lehetőségek felméréséhez érdemes átgondolni a következőket. Egy receptor funkcionális kapacitását minden agonistája „fogyasztja”, sőt, az eltérő típusú receptorokhoz kötődő, de azok izgatása révén ugyanazokat (vagy döntően ugyanazokat) a jelátviteli utakat használó agonisták is kölcsönösen csökkentik egymás receptorainak aktuálisan rendelkezésre álló funkcionális kapacitását. Ebből következően csak az abszolút követelmény, hogy

az összehasonlítható  $E/[A]$  görbék agonistája azonos legyen, a meghatározandó agonista lehet eltérő is, ha azonos vagy nagyrészt azonos szignáltranszdukciójú a  $E/[A]$  görbék felvételéhez használt agonistával. Egy korábbi vizsgálat során metakolin (acetyl-  $\beta$ -methylcholine; relatíve lassan bomló muszkarin receptor agonista) ismert koncentrációja bizonyult jól meghatározhatónak CPA  $E/[A]$  görbék segítségével izolált tengerimalac bal pitvaron (a becslések a tényleges érték körül egy nagyságrenden belül szórtak). A görbeillesztés révén kapott CPA koncentrációkat (amelyek ekviekvívák az előzetesen bemért metakolinnal) a Langmuir-Hill egyenlet segítségével algebrai úton számolták át metakolin koncentrációkra, natív metakolin illetve natív CPA  $E/[A]$  görbék adatai alapján (Gesztelyi és mtsai, 2004). Vagyis, a natív állapotban illetve a többlet  $[Ado]_{ISF}$  jelenlétében felvett CPA  $E/[A]$  görbék közötti különbség feltehetően alkalmas a kérdéses többlet  $[Ado]_{ISF}$  jellemzésére. (Az agonisták különböző voltának természetesen „ára” van: ilyenkor egy agonista adott koncentrációját egy másik agonista ekviekvív koncentrációjával határozzuk meg, amely eredményt kellő óvatossággal kell értelmezni.)

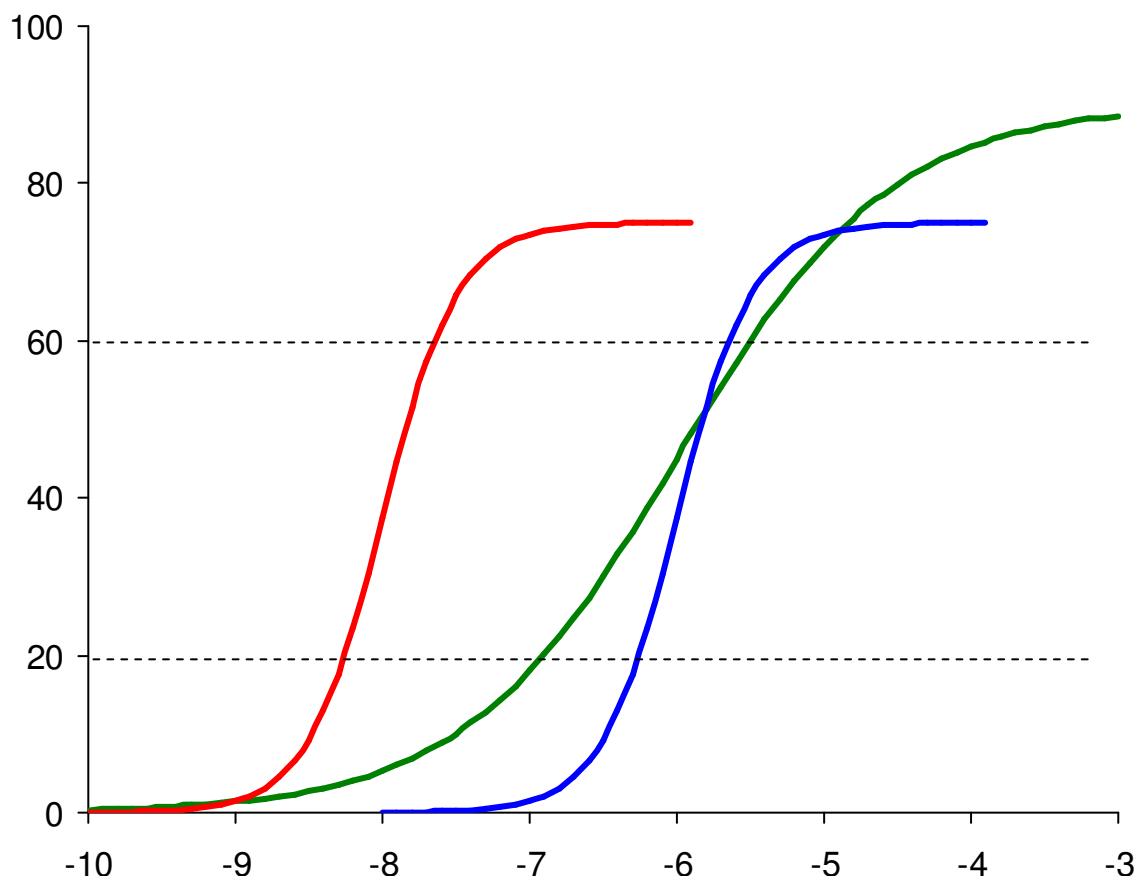
(5.) Fontos azonban, hogy a meghatározáshoz használt  $E/[A]$  görbék közötti különbséget kizárólag az Ado receptorok környezetében fennálló Ado koncentrációk különbsége okozza. Amennyiben a NT gátlás hatására létrejövő  $[Ado]_{ISF}$ -változás jellemzése a cél, a  $E/[A]$  görbék felvételéhez használt agonista sorsát nem befolyásolhatja a NT blokádnak. A CPA megfelelő agonista, mert vértelen pitvarszövetben csak igen lassan bomlik (Gesztelyi és mtsai, 2004), ezért megoszlását a NT gátlása nemigen befolyásolja (szemben az Ado-nal, amelyre nézve az intracelluláris átalakítás állandó transzmembranális koncentrációgrádienszt tart fenn). A CPA relatív rezisztenciája azért is kedvező, mert így a különböző enzim- illetve transzporter-aktivitású szöveteken kapott relatív jellemzők is összehasonlíthatók lesznek. A CPA további előnye, hogy szelektív  $A_1$  receptor agonista, ami megkönnyíti a vele kapott eredmények értelmezését (NT gátlás során az Ado extracellulárisan halmozódik fel, tehát az  $A_1$  receptorok kötőhelyének kompartmentjében).

(6.) Az RRM mérési tartományát a  $E/[A]$  görbe lefutása szabja meg. A meghatározás csak akkor pontos, ha a mérendő koncentráció (illetve annak ekviekvív mennyisége a  $E/[A]$  görbe felvételéhez használt agonistából) a natív  $E/[A]$  görbe középső (szemilogaritmikus ábrázolás mellett lineáris) szakaszára esik

(Gesztelyi és mtsai, 2004). Szerencsére ez a rész rendszerint több nagyságrendre kiterjed és magába foglalja a biológiailag legfontosabb koncentráció-tartományt (legalábbis az adott receptor működése szempontjából). Azt viszont szem előtt kell tartani, hogy a  $E/[A]$  görbe agonistájának hatékonysága („efficacy”) ne legyen kisebb, mint a meghatározandó agonistáé, mert az felülről behatárolja a meghatározható koncentráció-tartományt. Az Ado jellemzésére a CPA azért is megfelelő, mert mindketten teljes („full”) agonistái az  $A_1$  receptornak.

(7.) Ismert, hogy a receptorok működésének több jellemzője, mint például az affinitás és a tartalékreceptorok megléte („receptor reserve”), nem független az alkalmazott agonistától, vagyis ezek egy adott agonista-receptor pár jellemzői. Ebből következően ugyanazon receptor különböző agonistáinak hatása különbözhet még teljes agonisták esetében is, ami  $E/[A]$  görbéjük eltérő karakterisztikájában nyilvánul meg (összefoglalásként ld.: Dhalla és mtsai, 2003). További különbségek forrása lehet, ha az egyik agonista szelektív, a másik viszont kevésbé az. Ily módon, ha a meghatározandó agonista különbözik az RRM  $E/[A]$  görbéihez használt agonistától, a kapott becsléseket kellő óvatossággal kell összehasonlítani. Ha például azonos kísérleti feltételek mellett meghatározzuk két eltérő beavatkozás akut hatását az  $[Ado]_{ISF}$ -ra, vagy ugyanazon beavatkozás akut hatását az  $[Ado]_{ISF}$ -ra az adott szövet két eltérő állapotában, az RRM által szolgáltatott becslések különbsége (illetve aránya) nem feltétlenül tükrözi a meghatározandó koncentrációk különbségét (illetve arányát). Fontos azonban, hogy egy nagyobb becslés mindig nagyobb meghatározandó koncentrációt reprezentál, mivel az agonisták  $E/[A]$  görbéje szigorúan monoton növekvő (9. ábra; 5. táblázat). Egy agonista koncentrációjának egy másik agonista ekvieffektív koncentrációjával való jellemzése tehát hordozhat hasznosítható információt.

A fenti irodalmi adatokat, saját megfigyeléseket és elméleti megfontolásokat összegezve arra a hipotézisre jutottunk, hogy az  $[Ado]_{ISF}$   $A_1$  receptorok közelében fellépő akut változását az RRM informatívan jellemezheti, ha a  $E/[A]$  görbéket jól diffundáló, lassan eliminálódó, szelektív és teljes  $A_1$  receptor agonistával vesszük fel. Vértelen pitvaron a CPA megfelel ezeknek a kívánalmaknak.



**9. ábra.** Három sematikus  $E/[A]$  görbe az eltérő karakterisztika és lokalizáció következményeinek illusztrálására. Az x tengelyen az agonista koncentráció tízes alapú logaritmus, az y tengelyen pedig a százalékban kifejezett hatás látható. A piros és a kék függvény csak a kék görbe két nagyságrenddel nagyobb  $EC_{50}$ -ében különbözik egymástól. A zöld és a kék függvény  $EC_{50}$ -e egyenlő, de a zöld görbe  $E_{max}$ -a nagyobb, n értéke pedig kisebb, mint a másik két függvényé.

Az RRM analógiájára tételezzük fel, hogy a kék illetve a zöld görbe 20 % illetve 60 % hatáshoz tartozó koncentrációit a piros görbe 20 % illetve 60 % hatáshoz tartozó koncentrációival jellemezzük. Az azonos lefutású, de eltérő lokalizációjú piros és kék függvény ekviekvív koncentrációi nem egyenlők, de arányuk egyenlő. Az eltérő lefutású zöld függvény meghatározandó koncentrációit viszont a piros görbe ekviekvív koncentrációi nem aránytartóan jellemzik. Emiatt, ha ismeretlenek a kék illetve zöld függvény paraméterei, a piros függvény által szolgáltatott ekviekvív koncentrációk különbségéből illetve arányából nem tudunk a jellemzett koncentrációk különbségére illetve arányára következtetni. A sémás görbék adatait az 5. táblázat tartalmazza.

Az ábra illusztrálja az RRM egy másik lehetséges korlátját is. A zöld görbén a (kb.) 70 %-nál nagyobb hatást kiváltó koncentrációkat a piros görbe egyöntetűen 50 nM körüli koncentrációval jellemzi, mivel a piros függvény  $E_{max}$ -a kisebb, mint a zöldé (vagyis mérési tartományt veszítünk a felső részen).

Fontos azonban, hogy a fent említett korlátok ellenére a nagyobb hatáshoz mindegyik görbén nagyobb koncentráció tartozik, így a piros görbén egy nagyobb koncentrációhoz a kék illetve a zöld görbén is nagyobb ekviekvív koncentráció tartozik.

	Piros	Kék	Zöld
<b>C<sub>20</sub></b>	5.5 nM	0.55 µM	0.12 µM
<b>C<sub>60</sub></b>	22.6 nM	2.26 µM	3.18 µM
<b>C<sub>60</sub> - C<sub>20</sub></b>	17.1 nM	1.71 µM	3.06 µM
<b>C<sub>60</sub>/C<sub>20</sub></b>	4.1	4.1	26.5

**5. táblázat.** A 9. ábrán látható piros, kék és zöld E/[A] görbén a 20 % illetve 60 % hatáshoz tartozó koncentrációk (C<sub>20</sub> illetve C<sub>60</sub>), valamint ezek különbsége (C<sub>60</sub> - C<sub>20</sub>) és aránya (C<sub>60</sub>/C<sub>20</sub>) (kerekített értékek). Látható, hogy a kék görbe első három adata (C<sub>20</sub>; C<sub>60</sub>; C<sub>60</sub> - C<sub>20</sub>) pontosan két nagyságrenddel nagyobb a piros görbe megfelelő adatainál (összhangban a két nagyságrenddel nagyobb EC<sub>50</sub>-nel), a két koncentrációarány (C<sub>60</sub>/C<sub>20</sub>) pedig egyenlő. A mindhárom paraméterben (E<sub>max</sub>, EC<sub>50</sub>, n) különböző piros és zöld görbék minden adata (C<sub>20</sub>; C<sub>60</sub>; C<sub>60</sub> - C<sub>20</sub>; C<sub>60</sub>/C<sub>20</sub>) különböző.

## 6.2. A nukleozid transzport gátlás okozta adenzin-szint növekedés az A<sub>1</sub> receptorok környezetében tengerimalac pitvaron

Az *in vivo* kezelés nélküli állatokon végzett kísérletek során az [Ado]<sub>ISF</sub> *in vitro* DP és NBTI kezelés hatására bekövetkező változását két módszerrel jellemeztük: a klasszikus módszerrel és az RRM-mel, mely utóbbinak ez a vizsgálat volt az első felhasználása. A klasszikus módszerrel való meghatározást azért végeztük el, hogy annak eredménye az RRM számára összehasonlítási alapot jelentsen.

Mind a DP, mind az NBTI szignifikánsan csökkentette a tengerimalac bal pitvarok nyugalmi kontrakciós erejét (6. A ábra) és CPA-ra adott válaszát (7. A ábra). A nem nukleozid szerkezetű DP és a nukleozid analóg NBTI közös tulajdonsága, hogy hatékonyan gátolják az ENT1 típusú membranális Ado carriereket (összefoglalóként ld.: Thorn és Jarvis, 1996). Mivel metabolikusan intakt szívben az Ado eredő áramlása az interstitium felől a sejtek belsejébe történik (Deussen és mtsai, 1999), a DP és az NBTI hatását a kontrakciós erőre és a CPA-ra adott válaszra a NT gátlás miatti [Ado]<sub>ISF</sub> emelkedésnek tulajdoníthatjuk. A felszaporodó interstitialis Ado ugyanis a myocardialis A<sub>1</sub>



receptorok ingerlésével negatív inotrop hatást fejt ki (6. A ábra), ami által „elhasználja” az  $A_1$  receptorok negatív inotrop kapacitásának egy részét, így az ezt követően felvett CPA  $E/[A]$  görbe deprimált lesz (7. A ábra; ld.: 12.1. Egymást követő agonista-dózisok hatásának megjelenése a receptorfunkcióban).

Az RRM-mel kapott becslés szerint  $10 \mu\text{M}$  DP illetve NBTI hatására az  $[\text{Ado}]_{\text{ISF}}$  megemelkedett az izolált tengerimalac bal pitvarokban, a többlet Ado koncentráció az  $A_1$  receptorok mikrokörnyezetében  $16.1 \text{ nM}$  illetve  $20.4 \text{ nM}$  CPA-val volt ekvieffektív (4. Ø táblázat: Átlag 2 értékek). A meghatározott CPA koncentrációk természetesen egy pitvar esetében is átlagként értelmezendők, mivel a pitvarok elég kiterjedtek ahhoz, hogy az  $[\text{Ado}]_{\text{ISF}}$  növekedésében inhomogenitás fordulhasson elő a preparátumokon belül. Mindazonáltal a kapott  $c_x$  értékek egyedülállóak abban a tekintetben, hogy a gyorsan metabolizálódó Ado koncentrációjának NT gátlás okozta változását az  $A_1$  receptorok környezetében, vagyis egy olyan szöveti kompartmentben jellemzik, amely nagy jelentőségű a szív ischaemiához és hypoxiához való adaptációja szempontjából, ugyanakkor más módszerrel nehezen közelíthető meg.

Mivel az RRM-mel kapott  $c_x$  értékeink CPA koncentrációk, közvetlenül nem vehetők össze sem az  $[\text{Ado}]_{\text{ISF}}$  NT gátlás okozta növekedésére vonatkozó irodalmi adatokkal (2. táblázat), sem a klasszikus módszerrel kapott Ado koncentrációkkal. Ez okból Ado  $E/[A]$  görbe paraméterek bevonásával a  $16.1 \text{ nM}$  illetve  $20.4 \text{ nM}$  CPA-t  $25.5 \mu\text{M}$  illetve  $36.9 \mu\text{M}$  Ado-ra számoltuk át (4. Ø táblázat: Átlag 2 értékek). Korábban részletezett okokból kifolyólag (6.1.1. A Langmuir-Hill egyenlet használhatósága) azonban ezek az Ado koncentrációk nem az  $[\text{Ado}]_{\text{ISF}}$  növekedését mutatják, hanem azokat a szervkádbeli exogén Ado-szinteket, amelyek a pitvarszövet  $A_1$  receptorai közelében a kérdéses  $[\text{Ado}]_{\text{ISF}}$  növekedést létre tudják hozni. Mivel a szívizomban az exogén Ado gyorsan eliminálódik, a szervkádbeli és a receptorközeli Ado koncentrációk között feltehetően jelentős különbség alakul ki (az  $A_1$  receptorközeli  $[\text{Ado}]_{\text{ISF}}$  egy diffúzió, transzport és elimináció által létrehozott dinamikus egyensúly eredménye). Ebből következően a CPA szintek átszámítása Ado koncentrációkká ugyanazt a hibát viszi be az eredményekbe, mint a klasszikus módszer. Ezáltal az RRM CPA koncentrációinak Ado koncentrációkra való átszámítása a szakirodalmi adatokkal való összevetést ugyan nem könnyíti meg, viszont lehetővé teszi a klasszikus módszerrel kapott Ado koncentrációkkal történő korrekt összehasonlítást.

Az NT gátlás okozta  $[Ado]_{ISF}$  növekedést jellemző Ado koncentrációk (4. Ø táblázat: Átlag 1 értékek) elemzése szerint az eredmények variabilitásának hátterében az NT blokkerek különbözősége áll (DP vs. NBTI) és nem a két módszer közötti különbség (klasszikus módszer vs. RRM). Ebből az a következtetés vonható le, hogy a CPA alkalmazása az RRM során nem torzította lényegesen az  $[Ado]_{ISF}$  változásának jellemzését, ami alátámasztja kiindulási hipotézisünket. A klasszikus módszer során ugyanis nem használtunk fel mást, csak a NT inhibitorok negatív inotrop hatását, intakt Ado  $E/[A]$  görbe paramétereit és a klasszikus Langmuir-Hill egyenletet.

A fenti eredmény felhívja a figyelmet a két NT gátló hatása között mutatkozó érdekes különbségre. A DP kevésbé gyengítette a kontrakciós erőt, mint az NBTI (6. A ábra), viszont az NBTI-hez hasonló mértékben csökkentette a CPA negatív inotrop hatását (7. A ábra). Ez azzal függhet össze, hogy a DP, ellentétben az NBTI-vel, számos más hatással is bír a NT gátlásán túl. Gátol egy sor cAMP illetve cGMP bontó 3',5'-ciklikus nukleotid foszfodiészteráz (PDE5, PDE7, PDE8, PDE10, PDE11) (összefoglalóként ld.: Maurice és mtsai, 2003), amely hatás a szívben általában 1  $\mu$ M DP koncentráció felett jelentkezik (Pösch és mtsai, 1969). A DP inhibitora az ADA-nak is (Deuticke és Gerlach, 1966). Ezen kívül a DP fokozza a hosszú szénláncú zsírsavak felvételét a cardiomyocytákba azáltal, hogy indukálja FAT/CD36 zsírsav transzporter szarkolemmába való transzlokációját, mely hatás nem váltható ki NBTI-vel vagy Ado-nal (Luiken és mtsai, 2004). Érdekes, hogy eredményeink tanúsága szerint a DP NT gátláson kívüli hatásai jobban befolyásolják a nyugalmi kontrakciós erőt, mint a CPA-ra adott választ. Ezzel összhangban a CPA negatív inotrop hatásának csökkenéséből számított Ado koncentrációk (RRM) nem különböztek szignifikánsan a DP és az NBTI csoportok között, míg a nyugalmi kontrakciós erő gyengüléséből számolt Ado koncentrációk (klasszikus módszer) szignifikáns különbséget mutattak az eltérő NT blokkolóval kezelt csoportok között (ld.: 4. Ø táblázat). Ennek hátterében feltehetően az áll, hogy a DP NT gátláson kívüli hatásai jobban befolyásolják a kontrakciós erőt (amelyet több szignalizációs út is meghatároz), mint az  $A_1$  receptorfunkció inotrop részét.

Az *in vivo* kezeletlen tengerimalacokon végzett kísérleteinkből az alábbi következtetéseket vontuk le. (1.) Az  $A_1$  receptorok funkcionális állapotának meghatározása egy szelektív és relatíve stabil agonista  $E/[A]$  görbéjével (akár a

kontrakciós erő, mint változó, mérése mellett is) megbízhatóbb adatokat szolgáltat az  $[Ado]_{ISF}$  változásával kapcsolatban, mint a nyugalmi kontrakciós erőben beállt egyszeri változás detektálása. Ennek megfelelően az RRM megbízhatóbbnak mutatkozott, mint az egyébként azonos elvi alapokon nyugvó klasszikus módszer. (2.) A meghatározandótól eltérő agonista alkalmazása az RRM során nem aránytartó relatív mutatókat eredményez, de a nagyobb relatív mutató mindig a meghatározandó agonista nagyobb ekvifektív koncentrációját jelzi. A megbízhatóság érdekében bomlékony (vagy más okból nehezen mérhető) agonista esetében sokszor érdemes lemondani az abszolút koncentrációváltozás meghatározásáról és relatív jellemzőt használni. Továbbá, (3.) az NBTI alkalmasabb az NT inhibíció hatásainak tanulmányozásához, mint a kevésbé szelektív DP.

### **6.3. A hyperthyreoid állapot befolyása a nukleozid transzport gátlás okozta adozin-szint növekedésre a pitvari $A_1$ receptorok környezetében**

Az *in vivo* kezelt állatokon végzett kísérleteinkben az  $[Ado]_{ISF}$  NT gátlás hatására létrejövő változását hasonlítottuk össze eu- illetve hyperthyreoid pitvarizomzaton. Előző kísérleteink következtetéseinek megfelelően az  $[Ado]_{ISF}$  változását az RRM segítségével jellemeztük a CPA-ra adott inotrop válasz változása alapján, NT inhibitornak pedig a szelektív ENT1 gátló NBTI-t használtuk.

Az NBTI csökkentette a CPA-ra adott választ mind az S, mind a  $T_4$  kezelt pitvarokon (7. B, C ábra). Mivel az NBTI szelektív ENT1 inhibitor, a CPA hatásának csökkenéséért, legalábbis részben, a felszaporodó interstitialis Ado-t tehetjük felelőssé. Ez arra utal, hogy a hyperthyreosis nem változtatja meg a NT euthyreoid állapotban megfigyelt irányát tengerimalac pitvaron. Ezzel összhangban alakultak az RRM-mel meghatározott  $c_x$  értékek is (4. S és  $T_4$  táblázatok).

A  $c_x$ -ek értelmezése előtt érdemes végiggondolnunk, hogy a hyperthyreosis megváltoztatja az Ado több enzimének és transzporterének aktivitását (Pantos és

mtsai, 2004; Carneiro-Ramos és mtsai, 2004; Smolenski és mtsai, 1995). Mivel ezúttal nem használtunk fel Ado E/[A] görbe adatokat az RRM-hez, a CPA sorsát pedig nem befolyásolják a vértelen pitvarszövet enzimeit és transzportereit (Gesztelyi és mtsai, 2004), a CPA E/[A] görbék az A<sub>1</sub> receptorok funkcionális állapotát tükrözték. Hyperthyreoid állapotban ugyanakkor csökken maga az A<sub>1</sub> receptorfunkció is (Szentmiklósi és mtsai, 1992; Kaasik és mtsai, 1994; Gesztelyi és mtsai, 2003b; Karsai és mtsai, 2007). Ez sem hamisította meg azonban az eu- és a hyperthyreoid állapot RRM-mel történő összehasonlítását, mert az NBTI illetve ADA+NBTI kezelt alcsoportokat az azonos *in vivo* kezelt kontrollokhoz hasonlítottuk. Az A<sub>1</sub> receptorfunkció thyreoid hormon-függő sajátosságai benne foglaltnak ugyanis a kontroll pitvarok CPA E/[A] görbéinek E<sub>max</sub>, EC<sub>50</sub> és n paramétereiben, amelyek a koncentráció-meghatározó egyenletben az alapállapotot definiálták.

A NT gátlás okozta többlet [Ado]<sub>ISF</sub> CPA ekvivalense mintegy 2-2.5-szer nagyobb volt a hyperthyreoid pitvarokon, mint az euthyreoidokon (4. S és T<sub>4</sub> táblázat, NBTI kezelt alcsoportok). Ez azt sugallja, hogy (gátolatlan állapotban) az intracelluláris tér felé irányuló, ENT1-en keresztüli Ado transzport intenzitása nő a T<sub>4</sub> kezelés hatására a jól oxigenált tengerimalac pitvarszövetben. A fokozott NT hozzájárulhat az Ado és a hozzá hasonlóan erőteljesen transzportálódó Ado analógok hyperthyreota szívben tapasztalt csökkent hatásához (Szentmiklósi és mtsai, 1992; Gesztelyi és mtsai, 2003a, 2003b; Karsai és mtsai, 2007) azzal, hogy csökkenti az esélyét az Ado és az extracelluláris kötőhelyű Ado receptorok kapcsolódásának.

Az ENT1-en keresztüli Ado influx fokozódását elméletileg a következő változások okozhatják hyperthyreosisban: **(1.)** nagyobb extracelluláris Ado termelő enzim-aktivitás; **(2.)** nagyobb intracelluláris Ado elimináló (bontó és/vagy újrahasznosító) enzim-aktivitás; **(3.)** az ENT1 nagyobb részvétele a teljes NT-ban. Ezek a lehetőségek összhangban vannak egyes korábbi megfigyelésekkel. Carneiro-Ramos és mtsai (2004) az ekto-5'-nukleotidáz (a fő extracelluláris Ado termelő enzim) expressziójának és aktivitásának növekedését írták le patkány szívben, bár korábban Smolenski és mtsai (1995) ennek ellenkezőjét találták ugyancsak patkány szívben. Másrészt viszont Smolenski és mtsai (1995) az Ado kináz (a fő intracelluláris Ado újrahasznosító enzim) aktivitásának fokozódásáról is beszámoltak hyperthyreota patkány szívben. Az irodalmi adatok tehát fokozott

extracelluláris Ado termelésre és intracelluláris Ado eliminációra engednek következtetni, ami támogatja hyperthyreoid myocardiumon az intenzívebb NT fennállását, amire eredményeink utalnak. Smolenski és mtsai (1995) az Ado transzport maximális kapacitását is nagyobbak mérték hyperthyreoid patkány szívében. Amennyiben ezt a nagyobb transzport kapacitást az ENT1 nagyobb kapacitása okozná (erre vonatkozóan nem találtunk irodalmi adatot), az az ENT1 mediálta facilitált diffúzió hyperthyreosisbeli fokozott dominanciáját mutatná az egyszerű diffúzió (illetve esetlegesen más nukleozid transzporterek működése) fölött, ami szintén hozzájárulhatna a hyperthyreosisbeli intenzívebb NT-hoz (bővebben ld.: 12.3. Fick első törvényének alkalmazása a transzmembranális adenozin transzportra).

Mindazonáltal, akármilyen is a pontos mechanizmus, eredményünk szerint a thyreoid hormonok nem fordítják meg az Ado befelé mutató hajtóerejét. Ezt a befelé mutató hajtóerőt elméletileg az ENT1-ével ellenkező irányú transzportot mediáló koncentratív carrierok is erősíthetnék. Az általánosan elfogadott álláspont szerint azonban a cardiomyocytákon kizárólag ekvilibratív nukleozid carrier, azon belül is ENT1 található (Conant és Jarvis, 1994). Dekanski és mtsai (2004) szerint ugyan a tengerimalac szív a rajta áthaladó vérből koncentráció-gradiens ellenében is képes Ado-t felvenni, ez azonban az ENT1 mediálta transzporttal egyező irányú. Arra nézve semmilyen utalást nem találtunk a szakirodalomban, hogy a fiziológiásnál nagyobb mennyiségű thyreoid hormonok hatására a sejt belsejéből kifelé transzportáló CNT-ek expresszálnának a szívben. Vagyis, hyperthyreota szívben a megtartott vagy megnövekedett Ado-ra vonatkozó befelé mutató hajtóerőt feltehetően megtartott vagy megnövekedett nettó interstitialis Ado termelés hozza létre.

Megerősítve azt a feltételezésünket, hogy az NBTI negatív inotrop hatásáért extracelluláris Ado felhalmozódás a felelős, a beadott ADA csökkentette az NBTI hatását mind a nyugalmi kontrakciós erőre (6. ábra), mind a CPA-ra adott válaszra (7. B, C ábra; 3. S+T<sub>4</sub> táblázat). Relatív nagy molekulamérete miatt ugyanis az ADA nem jut át a szarkolemmán (Saito és mtsai, 1981), ezért az exogén ADA az extracelluláris térben maradva az extracelluláris Ado-t inozinná dezaminálja. Az inozin inotrop hatása elhanyagolható az Ado-éhoz képest (a munkacsoport korábbi megfigyelése). Az ADA ugyanakkor nem bontja a CPA-t (Pavan és IJerman, 1998), amelyet az RRM-hez használtunk. Az NBTI

hatásának teljes gátlását feltehetően az ADA rossz diffúziója hiúsította meg, amely az ADA nagy molekulaméretének következménye. Ez megfelel Zhu és mtsai (1992) korábbi megfigyelésének, mely szerint a hasonló koncentrációban alkalmazott ADA nem bontotta el teljesen még a fiziológias mennyiségben termelődő Ado-t sem tengerimalac szív interstitiumában.

*In vivo* S illetve T<sub>4</sub> kezelt tengerimalac bal pitvaron végzett kísérleteink tehát arra utalnak, hogy (1.) hyperthyreoid myocardiumban az ENT1 gátlása nagyobb interstitialis Ado akkumulációt okoz, mint euthyreoid viszonyok között. (2.) Ennek hátterét illetően arra következtettünk, hogy a T<sub>4</sub> nem változtatja meg a NT nettó irányát, sőt a hyperthyreoid pitvari cardiomyocytákon (gátolatlan állapotban) fokozódik befelé irányuló, ENT1-en keresztüli Ado transzport. (3.) Az RRM evidenciát szolgáltatott arra, hogy NT blokád során az A<sub>1</sub> receptorok fokozottan stimulált állapotban vannak mind az eu-, mind a hyperthyreoid pitvarokon, ugyanakkor ez az aktiváció nagyobb mértékű a hyperthyreoid preparátumokon. Mivel az A<sub>1</sub> receptorok és az általuk iniciált folyamatok a legtöbb specieszen (köztük tengerimalacban és emberben is) lényeges részei a szív ischaemiás és hypoxiás károsodásokkal szembeni védekezésének, az NT gátlók előreláthatólag fontos szerepet kapnak majd a hyperthyreota szíven folytatott további vizsgálatokban is.

## 7. Összefoglalás

Munkánk során az  $[Ado]_{ISF}$  NT gátlás okozta változásának jellemzésére két módszert használtunk fel és hasonlítottunk össze: algebrai számítást a Langmuir-Hill egyenletben kifejezett klasszikus összefüggés alapján, valamint regresszióanalízist a Langmuir-Hill egyenletből levezetett koncentráció-meghatározó egyenlet illesztése révén („receptorial responsiveness method”: RRM). Vizsgálataink szerint az RRM lehetővé teszi valamely agonista (illetve modulátor) receptorközei koncentrációváltozásának jellemzését azokban az esetekben is, amikor az agonista bomlékonysága miatt a Langmuir-Hill egyenlet erre nem használható. Ennek elsősorban akkor van jelentősége, ha az adott agonista koncentrációját az agonista receptorát tartalmazó kompartmentben más módszerrel nehéz pontosan meghatározni. Vagyis, egy bomlékony agonista közvetlenül gyakorlatilag mérhetetlen receptorközei koncentrációváltozását egy olyan stabil agonista ekvielektív koncentrációival jellemezhetjük, amely azonos (vagy nagyon hasonló) szignáltranszdukciójú, mint a bomlékony agonista.

Az RRM által szolgáltatott jellemző segítségével eltérő enzim- illetve transzporter-aktivitású szövetek bomlékony agonistáinak koncentrációváltozásai is összehasonlíthatóak. Ismert, hogy hyperthyreoid szívben megváltozik egy sor Ado specifikus enzim és carrier aktivitása. Mivel ezek a változások alig érintik a relatíve stabil CPA eliminációját vérmentes pitvarszöveten, a NT gátlás okozta  $[Ado]_{ISF}$  változást megbízhatóan kvantifikálja a CPA RRM segítségével meghatározott ekvielektív koncentrációja ( $c_x$ ). Eredményeink szerint hyperthyreoid pitvarokon az NT gátlás mintegy 2-2.5-szeres  $c_x$  növekedést okoz az euthyreoid pitvarokhoz képest, ami az  $[Ado]_{ISF}$  nagyobb mértékű növekedését mutatja hyperthyreoid pitvaron NT gátló jelenlétében. Ez arra utal, hogy a hyperthyreosis nem változtatja meg a NT fiziológiás irányát, sőt a hyperthyreoid állapotra fokozott intracelluláris tér felé irányuló NT jellemző az euthyreoid viszonyokhoz képest.

## 8. Summary

In our studies, two methods were used to characterize and compare the change in  $[Ado]_{ISF}$  elicited by NT blockade: an algebraic calculation based on the relationship expressed in the Langmuir-Hill equation, and a regression analysis by fitting a concentration determining equation derived from the Langmuir-Hill equation („receptorial responsiveness method”: RRM). On the basis of our results, the RRM enables the characterization of a change in concentration of an agonist or a modulator in the microenvironment of its receptor, when the Langmuir-Hill equation cannot be used due to degradability of the given agent. The impact of this method stems from the fact that concentration of degradable agents is difficult to assess in the compartment containing the receptors of the agents. By means of the RRM, changes in concentration of degradable agents practically immeasurable directly can be characterized by concentrations of stable agents, which have signal-transduction similar to degradable agents in question.

With the help of the index provided by the RRM, changes in concentration of degradable agents become comparable even between tissues with different enzyme and transporter activities. It is well-known that several enzyme and carrier activities are modified in the hyperthyroid heart. Since these alterations hardly affect elimination of CPA, a relatively stable compound in asanguineous atrial tissue, the change in  $[Ado]_{ISF}$  accompanying NT blockade can be reliably characterized by the equieffective concentration of CPA computed by the RRM ( $c_x$ ). Our results show that NT inhibition causes an increase in  $c_x$  approximately 2-2.5 fold greater in hyperthyroid atria than in euthyroid ones, indicating a greater increase in  $[Ado]_{ISF}$  elicited by NT blockade in hyperthyroid atria. It can be concluded that hyperthyroidism does not alter the physiological direction of NT; moreover it does enhance NT directed to the cell interior as compared to the euthyroid condition.



## 9. Irodalom

Alexander SPH, Mathie A, Peters JA (2001) TiPS Nomenclature Supplement 2001. *Trends Pharmacol Sci* 22 (Suppl. 1): 13-14

Arai M, Otsu K, MacLennan DH, Alpert NR, Periasamy M (1991) Effect of thyroid hormone on the expression of mRNA encoding sarcoplasmic reticulum proteins. *Circ Res* 69: 266-276

Bak MI, Ingwall JS (1998) Regulation of cardiac AMP-specific 5'-nucleotidase during ischemia mediates ATP resynthesis on reflow. *Am J Physiol* 274: C992-1001

Baker SP, Scammells PJ, Belardinelli L (2000) Differential A<sub>1</sub>-adenosine receptor reserve for inhibition of cyclic AMP accumulation and G-protein activation in DDT(1) MF-2 cells. *Br J Pharmacol* 130: 1156-1164

Bassingthwaite JB (1992) Interstitial adenosine: the measurement, the interpretation. *J Mol Cell Cardiol* 24: 337-346

Belardinelli L, Shryock JC., Song Y, Wang D, Srinivas M (1995) Ionic basis of the electrophysiological actions of adenosine on cardiomyocytes. *FASEB J* 9: 359-365

Bers DM (2001) Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force (második kiadás). *Developments in Cardiovascular Medicine* Vol. 237, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Bottinelli R, Canepari M, Cappelli V, Reggiani C (1995) Maximum speed of shortening and ATPase activity in atrial and ventricular myocardia of hyperthyroid rats. *Am J Physiol* 269 (3 Pt 1): C785-90

Bumgarner JR, Ramkumar V, Stiles GL (1989) Altered thyroid status regulates the adipocyte A<sub>1</sub> adenosine receptor system. *Life Sci* 44: 1705-1712.

Burnstock G (1978) A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: *Cell membrane receptors for drugs and hormones* (szerk.: Bolis L és Straub RW), Raven Press, New York: 107-118

Carneiro-Ramos MS, da Silva VB, Coutinho MB Jr, Battastini AM, Sarkis JJ, Barreto-Chaves ML (2004) Thyroid hormone stimulates 5'-ecto-nucleotidase of neonatal rat ventricular myocytes. *Mol Cell Biochem* 265: 195-201

Cernohorsky J, Kolar F, Pelouch V, Korecky B, Vetter R (1998) Thyroid control of sarcolemmal  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger and SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in developing heart. *Am J Physiol* 275 (1 Pt 2): H264-273

Conant AR, Jarvis SM (1994) Nucleoside influx and efflux in guinea-pig ventricular myocytes. Inhibition by analogues of lidoflazine. *Biochem Pharmacol* 48: 873-880.

Cornfield LJ, Hu S, Hurt SD, Sills MA (1992) [ $^3\text{H}$ ]2-phenylaminoadenosine ([ $^3\text{H}$ ]CV 1808) labels a novel adenosine receptor in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 263: 552-561

Decking UK, Juengling E, Kammermeier H (1988) Interstitial transudate concentration of adenosine and inosine in rat and guinea pig hearts. *Am J Physiol* 254: H1125-1132

De Jong JW, De Jonge R, Keijzer E, Bradamante S (2000) The role of adenosine in preconditioning. *Pharmacol Therapeut* 87: 141-149

Dekanski D, Piperski V, Tasic J, Markovic ID, Jokanovic M, Stukalov P, Mitrovic DM (2004) Transport of endogenous nucleosides in guinea pig heart. *Can J Physiol Pharmacol* 82: 1061-1067.

Deussen A, Stappert M, Schafer S, Kelm M (1999) Quantification of extracellular and intracellular adenosine production: understanding the transmembranous concentration gradient. *Circulation* 99: 2041-2047

Deussen A (2000a) Metabolic flux rates of adenosine in the heart. *N-S Arch Pharmacol* 362: 351-363

Deussen A (2000b) Quantitative integration of different sites of adenosine metabolism in the heart. *Ann Biomed Eng* 28: 877-883

Deuticke B, Gerlach E (1966) Kompetitive Hemmung der Adenisin-Deaminase als Mögliche Ursache der coronardilatierenden Wirkung einer Pyridopyrimidin-Verbindung. *Naunyn Schniedebergs Arch Pharmacol* 255: 107-119

Dhalla AK, Shryock JC, Shreeniwas R, Belardinelli L (2003) Pharmacology and Therapeutic Applications of  $\text{A}_1$  Adenosine Receptor Ligands. *Curr Top Med Chem* 3: 369-385

Eckle T, Krahn T, Grenz A, Kohler D, Mittelbronn M, Ledent C, Jacobson MA, Osswald H, Thompson LF, Unertl K, Eltzhig HK (2007) Cardioprotection by

ecto-5'-nucleotidase (CD73) and A<sub>2B</sub> adenosine receptors. *Circulation* 115: 1581-1590

El-Ani D, Jacobson KA, Shainberg A (1994) Characterization of adenosine receptors in intact cultured heart cells. *Biochem Pharmacol* 48: 727-735

Fazekas T (1999) Egy reneszánszát élő endogén anti-tachyarrhythmias anyag, az adenzin szív-elektrofiziológiai hatásai és klinikai alkalmazása. *Cardiol Hung* 28 (Suppl 1): 28-38

Ford WR, Broadley KJ (1999) Effects of K<sup>+</sup>-channel blockers on A<sub>1</sub>-adenosine receptor-mediated negative inotropy and chronotropy of guinea-pig isolated left and right atria. *Fundam Clin Pharmacol* 13: 320-329

Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53: 527-552

Gardner NM, Broadley KJ (1999) Analysis of the atypical characteristics of adenosine receptors mediating negative inotropic and chronotropic responses of guinea-pig isolated atria and papillary muscles. *Br J Pharmacol* 127: 1619-1626

Gesztelyi R, Zsuga J, Bajza Á, Cseppentő Á, Szabó JZ, Szentmiklósi AJ (2003a) Special sensitization pattern in adenosine-induced myocardial responses after thyroxine treatment. *J Pharmacol Sci* 91: 295-304

Gesztelyi R, Zsuga J, Hajdú P, Szabó JZs, Cseppentő Á, Szentmiklósi AJ (2003b) Positive inotropic effect of the inhibition of cyclic GMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE2) on guinea pig left atria in eu- and hyperthyroidism. *Gen Physiol Biophys* 22: 501-513

Gesztelyi R, Zsuga J, Juhász B, Dér P, Vecsernyés M, Szentmiklósi AJ (2004) Concentration estimation via curve fitting: quantification of negative inotropic agents by using a simple mathematical method in guinea pig atria. *Bull Math Biol* 66: 1439-1453

Gorman MW, Wangler RD, Bassingthwaite JB, Mohrman DE, Wang CY, Sparks HV (1991) Interstitial adenosine concentration during norepinephrine infusion in isolated guinea pig hearts. *Am J Physiol* 261: H901-909

Gøtzsche LB (1994) L-triiodothyronine acutely increases Ca<sup>2+</sup> uptake in the isolated, perfused rat heart. Changes in L-type Ca<sup>2+</sup> channels and beta-receptors during short- and long-term hyper- and hypothyroidism. *Eur J Endocrinol* 130: 171-179

Gupta RC, Neumann J, Watanabe AM (1993) Comparison of adenosine and muscarinic receptor-mediated effects on protein phosphatase inhibitor-1 activity in the heart. *J Pharmacol Exp Ther* 266: 16-22

Harrison GJ, Willis RJ, Headrick JP (1998) Extracellular adenosine levels and cellular energy metabolism in ischemically preconditioned rat heart. *Cardiovasc Res* 40: 74-87

Headrick JP (1996) Interstitial adenosine and function in rat heart in vivo: effects of adrenaline and 8-cyclopentyl-1,3-dimethylxanthine. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23: 386-394

Headrick JP, Hack B, Ashton KJ (2003) Acute adenosinergic cardioprotection in ischemic-reperfused hearts. *Am J Physiol* 285: H1797-1818

Hill AV (1909) The mode of action of nicotine and curari, determined by the form of the contraction curve and the method of temperature coefficients. *J Physiol (London)* 39: 361-373

Hill AV (1910) The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol (London)* 40: Proceedings iv-vii

Hutchinson SA, Scammells PJ (2004) A<sub>1</sub>(1) adenosine receptor agonists: medicinal chemistry and therapeutic potential. *Curr Pharm Des* 10: 2021-2039

Jahnel U, Nawrath H., Ochi R (1992) Adrenoceptor-mediated effects on calcium channel currents are antagonized by 5'-(N-ethyl)-carboxamido-adenosine in guinea-pig atrial cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 345: 564-569

Kaasik A, Minajeva A, Paju K, Eimre M, Seppet EK (1997a) Thyroid hormones differentially affect sarcoplasmic reticulum function in rat atria and ventricles. *Mol Cell Biochem* 176: 119-126

Kaasik A, Paju K, Vetter R, Seppet EK (1997b) Thyroid hormones increase the contractility but suppress the effects of beta-adrenergic agonist by decreasing phospholamban expression in rat atria. *Cardiovasc Res* 35: 106-112

Kaasik A, Seppet EK, Ohisalo JJ (1994) Enhanced negative inotropic effect of an A<sub>1</sub>-receptor agonist in rat left atria in hypothyroidism. *J Mol Cell Cardiol* 26: 509-517

Kiss E, Jakab G, Kranias EG, Edes I (1994) Thyroid hormone-induced alterations in phospholamban protein expression. Regulatory effects on sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> transport and myocardial relaxation. *Circ Res* 75: 245-251

Kreuzberg U, Theissen P, Schicha H, Schroder F, Mehlhorn U, de Vivie ER, Boknik P, Neumann J, Grohe C, Herzig S (2000) Single-channel activity and expression of atrial L-type Ca<sup>2+</sup> channels in patients with latent hyperthyroidism. *Am J Physiol* 278: H723-730

Kroll K, Deussen A, Sweet IR (1992) Comprehensive model of transport and metabolism of adenosine and S-adenosylhomocysteine in the guinea pig heart. *Circ Res* 71: 590-604

Kroll K, Stepp DW (1996) Adenosine kinetics in canine coronary circulation. *Am J Physiol* 270: H1469-1483

Kurachi Y, Nakajima T, Sugimoto T (1986) On the mechanism of activation of muscarinic potassium channels by adenosine in isolated atrial cells: Involvement of GTP-binding proteins. *Pflügers Arch* 407: 264-274

Linden J (2005) Adenosine in Tissue Protection and Tissue Regulation. *Mol Pharmacol* 67: 1385-1387

Longabaugh JP, Didsbury J, Spiegel A, Stiles GL (1989) Modification of the rat adipocyte A<sub>1</sub> adenosine receptor-adenylate cyclase system during chronic exposure to an A<sub>1</sub> adenosine receptor agonist: alterations in the quantity of G<sub>s</sub> alpha and G<sub>i</sub> alpha are not associated with changes in their mRNAs. *Mol Pharmacol* 36: 681-688

Luiken JJ, Coort SL, Willems J, Coumans WA, Bonen A, Glatz JF (2004) Dipyridamole alters cardiac substrate preference by inducing translocation of FAT/CD36, but not that of GLUT4. *Mol Pharmacol* 65: 639-645

Mager S, Palti Y, Binah O (1992) Mechanism of hyperthyroidism-induced modulation of the L-type Ca<sup>2+</sup> current in guinea pig ventricular myocytes. *Pflügers Arch* 421: 425-430

Maurice DH, Palmer D, Tilley DG, Dunkerley HA, Netherton SJ, Raymond DR, Elbatarny HS, Jimmo SL (2003) Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. *Mol Pharmacol* 64: 533-546

Mohrman DE, Heller LJ (1990) Transcapillary adenosine transport in isolated guinea pig and rat hearts. *Am J Physiol* 259: H772-783

Neumann J, Gupta RC, Jones LR, Bodor GS., Bartel S, Krause EG, Pask HT, Schmitz W, Scholz H, Watanabe AM (1995) Interaction of beta-adrenoceptor

and adenosine receptor agonists on phosphorylation. Identification of target proteins in mammalian ventricles. *J Mol Cell Cardiol* 27: 1655-1667

Ninomiya H, Otani H, Lu K, Uchiyama T, Kido M, Imamura H (2002) Complementary role of extracellular ATP and adenosine in ischemic preconditioning in the rat heart. *Am J Physiol* 282: H1810-1820

Obata T, Kubota S, Yamanaka Y (2001) Histamine increases interstitial adenosine concentration via activation of ecto-5'-nucleotidase in rat hearts in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 298: 71-76

Ojamaa K, Klein I, Sabet A, Steinberg SF (2000a) Changes in adenylyl cyclase isoforms as a mechanism for thyroid hormone modulation of cardiac beta-adrenergic receptor responsiveness. *Metabolism* 49: 275-279

Ojamaa K, Kenessey A, Klein I (2000b) Thyroid hormone regulation of phospholamban phosphorylation in the rat heart. *Endocrinology* 141: 2139-2144

Pantos C, Malliopolou V, Varonos DD, Cokkinos DV (2004) Thyroid hormone and phenotypes of cardioprotection. *Basic Res Cardiol* 99: 101-120

Pavan B, IJzerman AP (1998) Processing of adenosine receptor agonists in rat and human whole blood. *Biochem Pharmacol* 56: 1625-1632

Pearl JN, Headrick JP (2007) Adenosinergic cardioprotection: multiple receptors, multiple pathways. *Pharmacol Ther* 114: 208-221

Pearl J, Willems L, Headrick JP (2003) Receptor and non-receptor-dependent mechanisms of cardioprotection with adenosine. *Am J Physiol* 284: H519-527

Perlini S, Khoury EP, Norton GR, Chung ES, Fenton RA, Dobson JG Jr, Meyer TE (1998) Adenosine mediates sustained adrenergic desensitization in the rat heart via activation of protein kinase C. *Circ Res* 83: 761-771

Pösch G, Juan H, Kukovetz WR (1969) Einfluss von herz- und gefässwirksamen Substanzen auf die Aktivität der Phosphodiesterase. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 264: 293-294

Pracyk JB, Slotkin TA (1991) Thyroid hormone differentially regulates development of beta-adrenergic receptors, adenylyl cyclase and ornithine decarboxylase in rat heart and kidney. *J Dev Physiol* 16: 251-261

Rapiejko PJ, Malbon CC (1987) Short term hyperthyroidism modulates adenosine receptors and catalytic activity of adenylyl cyclase in adipocytes. *Biochem J* 241: 765-771

Rubinstein I, Binah O (1989) Thyroid hormone modulates membrane currents in guinea-pig ventricular myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 340: 705-711

Saito D, Steinhart CR, Nixon DG, Olsson RA (1981) Intracoronary adenosine deaminase reduces canine myocardial reactive hyperemia. *Circ Res* 49: 1262-1267

Schreieck J, Richardt G (1999) Endogenous adenosine reduces the occurrence of ischaemia-induced ventricular fibrillation in rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 31: 123-134

Schutz W, Schrader J, Gerlach E (1981) Different sites of adenosine formation in the heart. *Am J Physiol* 240: H963-970

Seppet EK, Kaasik A, Minajeva A, Paju K, Ohisalo JJ, Vetter R, Braun U (1998) Mechanism of thyroid hormone control over sensitivity and maximal contractile responsiveness to beta-adrenergic agonists in atria. *Mol Cell Biochem* 184: 419-426

Seppet EK, Kolar F, Dixon IM, Hata T, Dhalla NS (1993) Regulation of cardiac sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> channels and Ca<sup>2+</sup> transporters by thyroid hormone. *Mol Cell Biochem* 129: 145-159

Shenoy R, Klein I, Ojamaa K (2001) Differential regulation of SR calcium transporters by thyroid hormone in rat atria and ventricles. *Am J Physiol* 281: H1690-1696

Shryock JC, Belardinelli L (1997) Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am J Cardiol* 79: 2-10

Smolenski RT, Yacoub MH, Seymour AM (1995) Hyperthyroidism increases adenosine transport and metabolism in the rat heart. *Mol Cell Biochem* 143: 143-149.

Sommerschild HT, Kirkebøen KA (2000) Adenosine and cardioprotection during ischaemia and reperfusion – an overview. *Acta Anaesthesiol Scand* 44: 1038-1055

Stepp DW, Van Bibber R, Kroll K, Feigl EO (1996) Quantitative relation between interstitial adenosine concentration and coronary blood flow. *Circ Res* 79: 601-610

Szentmiklosi AJ, Cseppento A, Szabo JZ, Nosztray K, Szegi J (1992) Myocardial and vascular actions of purinoceptor activators are reduced after thyroxine treatment. *Pharmacol Res* 25 (Suppl. 2): 171-172

Szentmiklosi AJ, Kovacs T, Cseppento A, Szegi J (1983) On the possible mechanisms underlying the inhibitory action of adenosine (AR) in atrial myocardium of guinea pigs. In: Regulatory Function of Adenosine. Szerkesztők: Berne RM, Rall TW, Rubio R. Martinus Nijhoff Publishers, Boston: 543

Szentmiklosi AJ, Nemeth M, Cseppento A, Szegi J, Papp JG, Szekeres L (1982) Potentiation of the myocardial actions of adenosine in the presence of coformycin, a specific inhibitor of adenosine deaminase. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 256: 236-252

Takacs IE, Szabo J, Nosztray K, Szentmiklosi AJ, Cseppento A, Szegi J (1985) Alterations of contractility and sarcoplasmic reticulum function of rat heart in experimental hypo- and hyperthyroidism. *Gen Physiol Biophys* 4: 271-278

Tesmer JJ, Dessauer CW, Sunahara RK, Murray LD, Johnson RA, Gilman AG, Sprang SR (2000) Molecular basis for P-site inhibition of adenylyl cyclase. *Biochemistry* 39: 14464-14471

Thorn JA, Jarvis SM (1996) Adenosine transporters. *Gen Pharmacol* 27: 613-620

Van Belle H (1993) Nucleoside transport inhibition: A therapeutic approach to cardioprotection via adenosine? *Cardiovasc Res* 27: 68-76

Van Rossum JM (1963) Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 143: 299-330

Van Wylen DG, Schmit TJ, Lasley RD, Gingell RL, Mentzer RM Jr (1992) Cardiac microdialysis in isolated rat hearts: interstitial purine metabolites during ischemia. *Am J Physiol* 262: H1934-1938

Wangler RD, Gorman MW, Wang CY, DeWitt DF, Chan IS, Basingthwaite JB, Sparks HV (1989) Transcapillary adenosine transport and interstitial adenosine concentration in guinea pig hearts. *Am J Physiol* 257: H89-106

Willems L, Reichelt ME, Molina JG, Sun CX, Chunn JL, Ashton KJ, Schnermann J, Blackburn MR, Headrick JP (2006) Effects of adenosine



deaminase and A<sub>1</sub> receptor deficiency in normoxic and ischaemic mouse hearts.

*Cardiovasc Res* 71: 79-87

Zhu QY, Headrick JP, Berne RM (1991) Transmural distribution of extracellular purines in isolated guinea pig heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 657-660

Zhu Q, Matherne GP, Curnish RR, Tribble CG, Berne RM (1992) Effect of adenosine deaminase on cardiac interstitial adenosine. *Am J Physiol* 263: H1322-1326

## 10. Saját tudományos munkák

### Az értekezés alapjául szolgáló teljes közlemények

**Karsai D**, Zsuga J, Juhász B, Dér P, Szentmiklósi AJ, Tósaki Á, Gesztelyi R (2006) Effect of nucleoside transport blockade on the interstitial adenosine level characterized by a novel method in guinea pig atria. *J Cardiovasc Pharmacol* 47: 103-109 (IF: 1.625)

A javított online verzió letölthető a következő linkről:

<http://www.cardiovascularpharm.com/pt/re/jcardiopharm/fulltext.00005344-200602000-000015.htm>

**Karsai D**, Gesztelyi R, Zsuga J, Jakab A, Szendrei L, Juhász B, Bak I, Szabó G, Lekli I, Vecsernyés M, Varga E., Szentmiklósi AJ, Tósaki Á (2007) Influence of hyperthyroidism on the effect of adenosine transport blockade assessed by a novel method in guinea pig atria. *Cell Biochem Biophys* 47: 45-52 (IF: 1.693)

### Az értekezés témájához kapcsolódó teljes közlemény

Kemény-Beke Á, Jakab A, Zsuga J, Vecsernyés M, **Karsai D**, Pásztor F, Greczer M, Szentmiklósi AJ, Berta A, Gesztelyi R (2007) Adenosine deaminase inhibition enhances the inotropic response mediated by A<sub>1</sub> adenosine receptor in hyperthyroid guinea pig atrium. *Pharmacol Res* 56: 126-133 (IF: 2.421)

### Az értekezés témájához kapcsolódó poszterek és absztraktok

Gesztelyi R, **Karsai D**, Zsuga J, Szentmiklósi AJ, Tósaki Á (2004) A nukleozid transzport gátlásának hatása az interszticiális adenzin szintjére eu- és

hipertiroid tengerimalac bal pitvaron. A Magyar Klinikai Farmakológusok VI. Továbbképző Kongresszusa, Debrecen

Gesztelyi R, **Karsai D**, Zsuga J, Vecsernyés M, Tósaki Á (2005) An old-new approach for estimating the change in interstitial adenosine concentration in guinea pig left atria. A Magyar Experimentális Farmakológia Tavasz Szimpóziuma, Budapest, p. 18

Zsuga J, Gesztelyi R, **Karsai D**, Szentmiklósi AJ, Tósaki Á (2005) Implementation of concentration-response curves for concentration estimation: the extension of the scope of the Langmuir–Hill equation. A Magyar Experimentális Farmakológia Tavasz Szimpóziuma, Budapest, p. 79

**Karsai D**, Zsuga J, Pásztor F, Jakab A, Juhász B, Gesztelyi R, Szentmiklósi AJ, Tósaki Á (2006) Az adenosin dezamináz gátlása által kiváltott intracelluláris adenosin felhalmozódás hatása az A<sub>1</sub> adenosin receptorok válaszkészségére hyperthyreoid tengerimalacok bal pitvarán. MÉT LXX. Vándorgyűlése, Szeged 2006, p. 241

**Karsai D**, Kemény-Beke A, Pásztor F, Jakab A, Szentmiklósi AJ (2006) Intracellular adenosine accumulation elicited by adenosine deaminase inhibition enhances the responsiveness of A<sub>1</sub> adenosine receptors in hyperthyroid guinea pig atria. *Acta Physiol Hung* 93: 190

**Karsai D**, Zsuga J, Pásztor F, Jakab A, Juhász B, Gesztelyi R, Szentmiklósi J, Tósaki Á (2006) Az adenosin dezamináz gátlása által kiváltott intracelluláris adenosin felhalmozódás hatása az A<sub>1</sub> adenosin receptorok válaszkészségére hyperthyreoid tengerimalacok bal pitvarán. Kórházi Gyógyszerészek XV. Kongresszusa, Eger, P11

Vecsernyés M, Dér P, Gesztelyi R, **Karsai D**, Tósaki Á, Juhász B (2007) Hemoxygenase-1 enzymes involves in the cardioprotective effect of the alpha-melanocyte-stimulating hormone. *J Mol Cell Cardiol* 42(Suppl 1) S208 (IF: 4.859)

## **Könyvfejezetek**

Dr. Bánki M. Csaba, Dr. Bereczki Dániel (szerk.) Fókuszban a neurológia és pszichiátria – hatóanyagok, készítmények, terápia. Melinda Kiadó, Budapest 2005.

Dr. Nemesánszky Elemér (szerk.) Fókuszban a gasztroenterológia – hatóanyagok, készítmények, terápia. Melinda Kiadó, Budapest 2006.

Dr. Strausz János (szerk.) Fókuszban a légzőszervrendszer – hatóanyagok, készítmények, terápia. Melinda Kiadó, Budapest 2007.

## 11. Tárgyszavak

Magyar: interstitialis adenzin; nukleozid transzport; pajzsmirigyhormonok; A<sub>1</sub> adenzin receptor; pitvar; szív; tengerimalac; receptoriális válaszkésztség módszer (RRM)

Angol: interstitial adenosine; nucleoside transport; thyroid hormones; A<sub>1</sub> adenosine receptor; atria; heart; guinea pig; receptorial responsiveness method (RRM)

## 12. Függelék

### 12.1. Egymást követő agonista-dózisok hatásának megjelenése a receptorfunkcióban

Illusztrálandó a kapcsolatot egy agonista koncentráció és a receptor ennek jelenlétében kialakuló válaszkészsége között, tekintsük az alábbi egyszerű példát. Ha CPA-t mérünk izolált tengerimalac bal pitvarhoz gyakorlatilag maximális inotrop választ kiváltó koncentrációban (pl. 10  $\mu\text{M}$ ), a kontrakciós erő a kiindulási érték mintegy 10 %-ára csökken, vagyis a válasz  $\frac{x - 0.1x}{x} \cdot 100\% = 90\%$  lesz, ahol  $x$  a kiindulási kontrakciós erő;  $0.1 x$  a CPA által maximálisan lecsökkentett kontrakciós erő. Következésképp, a nyugalmi kontrakciós erő legfeljebb  $0.9 x$ -el csökkenthető az  $A_1$  receptorok aktiválása révén.

Amennyiben viszont előzőleg a pitvarhoz mérjük egy  $A_1$  receptor agonista félhatásos dózisát (pl. 10 nM CPA vagy 10  $\mu\text{M}$  Ado, csak ez utóbbit folyamatosan fenn kell tartani), és a kialakult kontrakciós erőt tekintjük kiindulási értéknek (amelyik  $0.55 x$  lesz, mert  $0.45 x$ -et, vagyis a  $0.9 x$  felét le kell vonni az  $x$ -ből), akkor az ezután beadott 10  $\mu\text{M}$  CPA hatása csak  $\frac{0.55x - 0.1x}{0.55x} \cdot 100\% \approx 82\%$  lesz.

Fontos megjegyezni, hogy a 90 % és a 82 % egyaránt maximálisan stimulált  $A_1$  receptorok mellett kerültek meghatározásra ugyanazon a szövettípuson.

Ezen összefüggés alapján meg lehet határozni az elsőként beadott 10 nM-os CPA koncentrációt (illetve a folyamatosan fennálló 10  $\mu\text{M}$  Ado-t, de mint 10 nM CPA-t), mégpedig a 10  $\mu\text{M}$ -os CPA koncentrációra adott válasz csökkenéséből (90 % helyett 82 %). Gyakorlati szempontból fontos tény, hogy az  $A_1$  receptorok deszenzitizációja lassú, órákig nem számottevő (Longabaugh és mtsai, 1989; Baker és mtsai, 2000), így figyelmen kívül hagyható.

## 12.2. A koncentráció-meghatározó egyenlet levezetése

### 12.2.1. Levezetés egy kontrakciós erőt csökkentő receptorválaszból kiindulva

Tekintsünk egy nyugalmi állapotában állandó nagyságú kontrakciókat generáló biológiai rendszert, valamint egy agonistát, amely specifikus receptorhoz kötődve csökkenti az összehúzódások amplitúdóját (kontrakciós erő). A rendszer nyugalmi kontrakciós ereje ( $F_0$ ) az agonista egy általunk bemért  $c_{ad}$  koncentrációjának jelenlétében  $F_{ad}$  lesz, amiből az  $E_{ad}$  választ (hatást) meghatározhatjuk, mint a kiindulási erő százalékos csökkenését:

$$E_{ad} = \frac{F_0 - F_{ad}}{F_0} \cdot 100 (\%) \quad [1a]$$

Vizsgáljuk meg azt az esetet, amikor a rendszer az adott agonista egy  $c_x$  koncentrációját tartalmazza, amelyet nem ismerünk. Ha ekkor mérjük be a  $c_{ad}$ -ot és kiindulási erőnek a  $c_x$  jelenlétében kialakult  $F_x$ -et vesszük, a  $c_{ad}$  bemérése után beállt  $F_{(x+ad)}$  erőből csak torzult választ ( $E'$ ) számolhatunk (a torzítatlan hatást ugyanis a szintén ismeretlen  $F_0$ -ból és a  $(c_x+c_{ad})$  koncentrációból lehetne megkapni):

$$E' = \frac{F_x - F_{(x+ad)}}{F_x} \cdot 100 = 100 - \frac{100F_{(x+ad)}}{F_x} \quad [2a]$$

Az  $F_x$  és az  $F_{(x+ad)}$  kifejezhetők a  $c_x$  és a  $(c_x+c_{ad})$  koncentrációk (torzítatlan) hatásaiból,  $E_x$ -ből és  $E_{(x+ad)}$ -ből:

$$E_x = \frac{F_0 - F_x}{F_0} \cdot 100 \quad \text{és} \quad E_{(x+ad)} = \frac{F_0 - F_{(x+ad)}}{F_0} \cdot 100 \quad ; \text{ ezekből:}$$

$$F_x = F_0 - E_x \cdot \frac{F_0}{100} = F_0 \cdot \left(1 - \frac{E_x}{100}\right) \quad [3a]$$

$$F_{(x+ad)} = F_0 - E_{(x+ad)} \cdot \frac{F_0}{100} = F_0 \cdot \left(1 - \frac{E_{(x+ad)}}{100}\right) \quad [4a]$$

A [3a] és [4a] egyenletből az  $F_x$  és  $F_{(x+ad)}$  beírhatók a [2a] egyenletbe:

$$E' = 100 - \frac{100F_0 \cdot \left(1 - \frac{E_{(x+ad)}}{100}\right)}{F_0 \cdot \left(1 - \frac{E_x}{100}\right)} = 100 - \frac{100 - E_{(x+ad)}}{1 - \frac{E_x}{100}} = 100 - \frac{100 \cdot (100 - E_{(x+ad)})}{100 - E_x} \quad [5a]$$

Az  $E_x$  és az  $E_{(x+ad)}$  kifejezhetők a Langmuir-Hill egyenlet segítségével a létrehozó koncentrációkból  $/c_x$  és  $(c_x+c_{ad})/$ , valamint az adott agonista és receptora kapcsolatát leíró paraméterekből:

$$E_x = E_{\max} \cdot \frac{c_x^n}{c_x^n + EC_{50}^n} \quad \text{és} \quad E_{(x+ad)} = E_{\max} \cdot \frac{(c_x + c_{ad})^n}{(c_x + c_{ad})^n + EC_{50}^n} \quad [6a] \text{ és } [7a]$$

Mivel a  $c_x$ -et és a  $c_{ad}$ -ot ugyanazon agonista koncentrációinak tekintettük, a [6a] és [7a] egyenletben szereplő  $E_{\max}$ ,  $EC_{50}$  és  $n$  paramétereket azonosak. A [6a] és [7a] egyenletből az  $E_x$  és az  $E_{(x+ad)}$  beírhatók az [5a] egyenletbe, így  $E'$  visszavezethető a bemért koncentrációra ( $c_{ad}$ ), valamint konstans paraméterekre ( $c_x$ ,  $E_{\max}$ ,  $EC_{50}$ ,  $n$ ):

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

Vagyis, a koncentráció-meghatározó egyenlethez jutottunk (ld.: 2.5. Koncentrációváltzás becslése koncentráció-hatás görbe regresszióanalízisével). A koncentráció-meghatározó egyenlet egy  $E/[A]$  görbe adatainak elemzésekor meghatározhatóvá teszi a rendszer ismeretlen  $c_x$  előzetes agonista-tartalmát (és ebből a szintén ismeretlen  $F_0$  nyugalmi kontrakciós erőt) a kiindulási erőből ( $F_x$ )



számolt hatás ( $E'$ ) és az agonista-rendszer kapcsolat jellemzői ( $E_{max}$ ,  $EC_{50}$ ,  $n$ ) segítségével. Ha az  $E'/c_{ad}$  görbéhez rendelkezünk a neki megfelelő  $E/c_{ad}$  görbe  $E_{max}$ ,  $EC_{50}$  és  $n$  paramétereivel, vagyis az intakt  $E/[A]$  kapcsolat azonos körülmények között meghatározott jellemzőivel, ezeket beírhatjuk a koncentráció-meghatározó egyenletbe. Ha ezután a koncentráció-meghatározó egyenletet illesztjük az  $E' - c_{ad}$  pontokra, megkaphatjuk a  $c_x$ -et, mint regressziós paramétert (Gesztelyi és mtsai, 2004). Fontos szem előtt tartani, hogy amennyiben a koncentráció-meghatározó egyenletet a fenti formájában kívánjuk illeszteni, a kontrakciós erő csökkenését az  $E'/c_{ad}$  görbe kiindulási kontrakciós erejének százalékában kell megadni, mint hatást.

### 12.2.2. Levezetés általános esetből kiindulva

A koncentráció-meghatározó egyenlet nem tartalmazza a levezetés kezdetén használt rendszerspecifikus kontrakciós erőket, ami arra utal, hogy általános összefüggéshez jutottunk. Ennek demonstrálására elvégezzük a levezetést általános esetből kiindulva is.

Jellemezzük egy receptor működését egy  $Z$  kimeneti változóval, amely  $Z_{min}$  és  $Z_{max}$  értékek között változhat,  $Z_{max} - Z_{min}$  tehát a receptorfunkció teljes kapacitása. Tekintsünk egy agonistát, amelynek egy általunk bemért  $c_{ad}$  koncentrációja  $Z_{min}$ -ről  $Z_{ad}$ -ra növeli a  $Z$  értékét. A  $c_{ad}$  jelenlétében tehát a receptorfunkció változása  $Z_{ad} - Z_{min}$  lesz, amelyből a választ ( $E_{ad}$ ) a teljes működési kapacitás százalékában fejezzük ki:

$$E_{ad} = \frac{Z_{ad} - Z_{min}}{Z_{max} - Z_{min}} \cdot 100 (\%) \quad [1b]$$

Vizsgáljuk meg azt az esetet, amikor úgy mérjük be a  $c_{ad}$ -ot, hogy a rendszer előzőleg már az adott agonista egy ismeretlen koncentrációját ( $c_x$ ) is tartalmazta, tehát a  $Z$  kiindulási értéke  $Z_x$  volt. Ha mind a  $c_x$ -et, mind a hatását figyelmen kívül hagyjuk, a  $c_{ad}$  jelenlétében kialakuló  $Z_{(x+ad)}$ -ből a receptorfunkció változását  $Z_{(x+ad)} - Z_x$  formában számoljuk és ezt nem a teljes, hanem egy  $Z_{max} - Z_x$  kiindulási kapacitás százalékában fejezzük ki, ami egy torzult hatást ( $E'$ ) eredményez:

$$E' = \frac{Z_{(x+ad)} - Z_x}{Z_{\max} - Z_x} \cdot 100 \quad [2b]$$

A  $Z_{(x+ad)}$  és a  $Z_x$  kifejezhetők a  $(c_x + c_{ad})$  és a  $c_x$  koncentrációk (torzítatlan) hatásaiból ( $E_{(x+ad)}$  és  $E_x$ ):

$$E_{(x+ad)} = \frac{Z_{(x+ad)} - Z_{\min}}{Z_{\max} - Z_{\min}} \cdot 100 \quad \text{és} \quad E_x = \frac{Z_x - Z_{\min}}{Z_{\max} - Z_{\min}} \cdot 100 \quad ; \text{ ezekből:}$$

$$Z_{(x+ad)} = \frac{E_{(x+ad)} \cdot (Z_{\max} - Z_{\min})}{100} + Z_{\min} \quad \text{és} \quad Z_x = \frac{E_x \cdot (Z_{\max} - Z_{\min})}{100} + Z_{\min} \quad [3b] \text{ és } [4b]$$

A [3b] és [4b] egyenletekből  $Z_{(x+ad)}$  és  $Z_x$  beírhatók a [2b] egyenletbe:

$$E' = \frac{\frac{E_{(x+ad)} \cdot (Z_{\max} - Z_{\min})}{100} + Z_{\min} - \frac{E_x \cdot (Z_{\max} - Z_{\min})}{100} - Z_{\min}}{Z_{\max} - \frac{E_x \cdot (Z_{\max} - Z_{\min})}{100} - Z_{\min}} \cdot 100$$

$$E' = \frac{E_{(x+ad)} \cdot (Z_{\max} - Z_{\min}) - E_x \cdot (Z_{\max} - Z_{\min})}{(Z_{\max} - Z_{\min}) - \frac{E_x \cdot (Z_{\max} - Z_{\min})}{100}} = \frac{E_{(x+ad)} - E_x}{1 - \frac{E_x}{100}}$$

$$E' = \frac{100E_{(x+ad)} - 100E_x}{100 - E_x} = \frac{10000 - 100E_x - 10000 + 100E_{(x+ad)}}{100 - E_x}$$

$$E' = \frac{100 \cdot (100 - E_x) - 100 \cdot (100 - E_{(x+ad)})}{100 - E_x} = 100 - \frac{100 \cdot (100 - E_{(x+ad)})}{100 - E_x} \quad [5b]$$

A [5b] egyenlet jobb oldala megegyezik az [5a] egyenlet jobb oldalával, innentől az  $E'$  kifejezése a  $c_x$ ,  $c_{ad}$ ,  $E_{\max}$ ,  $EC_{50}$  és  $n$  mennyiségekkel ugyanaz, mint amit a kontrakciós erőt csökkentő receptorválaszból kiindulva láthattunk. Amennyiben tehát a koncentráció-meghatározó egyenletet görbeillesztésre használjuk, a hatást kifejezhetjük egy tetszőleges receptorfunkció kiindulási

értékhez képesti változásának a receptorfunkció kiindulási kapacitására vonatkoztatott százalékában is.

### 12.3. Fick első törvényének alkalmazása a transzmembranális adenzin transzportra

Fick első törvénye szerint egy (egyszerű vagy facilitált) diffúzió révén  $A$  keresztmetszeten áthaladó  $n$  anyagmennyiség egyenlő a  $D$  diffúzióállandó, az  $A$  keresztmetszet, az áramlás irányába eső  $\Delta c/l$  koncentrációgradiens ( $l$  távolságon  $\Delta c = c_{\text{nagyobb}} - c_{\text{kisebb}}$  koncentrációkülönbség mól/m<sup>3</sup>-ben kifejezve) és a  $t$  áramlási idő szorzatával:

$$n = DA \frac{\Delta c}{l} t$$

A szorzatot megfelelően átrendezve az Ohm törvénnyel analóg összefüggést kapunk, ahol  $I$  az áramlás erőssége,  $U$  a hajtóerő,  $R$  pedig az áramlással szembeni ellenállás:

$$\frac{n}{t} = \frac{\Delta c}{\frac{l}{DA}} \quad I = \frac{U}{R}$$

Tudjuk, hogy megfelelő tápanyag és oxigénellátás mellett, valamint egyenletes (és nem extrém nagy) terhelés esetén egy cardiomyocytába időben nagyjából állandó Ado mennyiség lép be (döntően vagy kizárólag) ENT1-en keresztül. Az ENT1 NBTI általi gátlása az  $R=l/DA$  növekedéseként jelentkezik, amelynek hatására csökken az  $I=n/t$ . Mivel az NBTI nem befolyásolja az Ado termelő illetve elimináló enzimek aktivitását, a kisebb befelé irányuló  $I$  miatt extracelluláris Ado-szint növekedés és intracelluláris Ado-szint csökkenés alakul ki. A transzmembrán Ado koncentrációkülönbség növekedése azonban növeli az  $U=\Delta c$  hajtóerőt, vagyis  $I$  a kezdeti csökkenés után nőni kezd. Az új egyensúly akkor áll be, amikor az időegység alatt termelt extracelluláris Ado-többlet gátolt

ENT1 mellett is időegység alatt teljes egészében átlép a szarkolemmán, vagyis az  $I$  visszaáll a kiindulási (vagy ahhoz közeli) szintre. Egyensúlyban az  $[Ado]_{ISF}$  állandósul, melyet a kontrakciós erő stabilizálódása jelez.

Hyperthyreoid preparátumainkon az ENT1 gátlása nagyobb  $[Ado]_{ISF}$  növekedést okozott, mint az euthyreoidokon. Mivel az  $[Ado]_{ISF}$  növekedést hasonló mértékű intracelluláris Ado-szint csökkenés kíséri, ez azt jelenti, hogy gátolt ENT1 mellett a hyperthyreoid pitvarokon nagyobb  $U=\Delta c$  hajtóerő szükséges az eredeti  $I$  fenntartásához, mint az euthyreoidokon. Fick első törvénye alapján ezt a következő (egymást ki nem záró) változások okozhatják a hyperthyreoid pitvarokban:

(1.) Nagyobb nettó extracelluláris Ado termelés és vele összefüggő nagyobb nettó intracelluláris Ado elimináció (ezek számértéke egyensúlyban szükségszerűen egyenlő, ugyanis egyensúlyban annyi Ado eliminálódik, amennyi termelődik). Ennek oka lehet:

- a) nagyobb extracelluláris Ado termelő enzim-aktivitás;
- b) nagyobb intracelluláris Ado elimináló enzim-aktivitás.

(2.) Az ENT1 nagyobb részesedése a teljes NT-ból. Ha ugyanis az ENT1 mediálta transzport nagyobb arányú a hyperthyreoid szívben, akkor az NBTI nagyobb ellenállás-növekedést okoz, tehát nagyobb hajtóerő-növekedésre van szükség az áramerősség visszaállításához. Ha tengerimalac bal pitvaron csak ENT1 található, akkor az egyszerű transzmembranális diffúzió jelenti az alternatív utat. Ha egyéb típusú transzporterek is előfordulnak, ezek jelenléte nem jelent elvi változást a fent leírtakhoz képest, még ha koncentratív működésűek is. Egy, a koncentrációgradienst növelő koncentratív transzport csak növeli az inward ekvibratív transzport intenzitását. Egy, a koncentrációgradienst csökkentő koncentratív transzport ugyan csökkenti az inward ekvibratív transzportot, esetünkben azonban nem szüntethette meg (illetve nem fordíthatta meg), hiszen az NBTI extracelluláris Ado felhalmozódást okozott, ami inward ENT1-en keresztüli fluxust jelez.

## 13. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki elsőként témavezetőmnek, Dr. Tósaki Árpád egyetemi tanárnak (DE OEC Gyógyszerhatástani Tanszék) munkám irányításáért, szakmai tanácsaiért és az értekezés alapjául szolgáló közlemények megírásában nyújtott segítségéért.

Köszönöm Dr. Gesztelyi Rudolf egyetemi tanársegéd (DE OEC Gyógyszerhatástani Tanszék) segítségét kísérletes és elméleti munkám során.

Köszönöm Szabó Gergő rezidensnek (DE OEC Gyógyszerhatástani Tanszék) kéziratom elolvasását és azzal kapcsolatban tett javaslatait.

Köszönöm Dr. Pintér Ákos egyetemi docensnek (DE TEK Matematikai Intézet) a regresszióanalízishez használt egyenlet általános esetre való értelmezésében nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom korábbi munkahelyem vezetőjének, Dr. Trestyánszky Zoltán főgyógyszerésznek (DE OEC Egyetemi Gyógyszertár) munkám ideje alatt tanúsított türelméért.

Köszönöm végül Dr. Szentmiklósi József egyetemi docensnek (DE OEC Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet), hogy lehetővé tette kísérletes munkám elvégzését az általa vezetett Keringéscsökkentőfarmakológiai Laboratóriumban.

### Tématámogatás

A kísérletes munka anyagi fedezetét részben témavezetőm OTKA T-46145 és RET-006/2004 témátámogatása, részben Dr. Szentmiklósi József ETT 202/2003 témátámogatása biztosította.