

# EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

Dr. Grenczer Mária

## **A receptoriális válaszkésztség módszer (RRM) hasznosíthatósága és megbízhatósága, különös tekintettel az agonisták és a biológiai rendszer tulajdonságainak befolyására**



DEBRECENI EGYETEM  
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA  
DEBRECEN, 2011.

# EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

Dr. Grenczer Mária

## **A receptoriális válaszkésztség módszer (RRM) hasznosíthatósága és megbízhatósága, különös tekintettel az agonisták és a biológiai rendszer tulajdonságainak befolyására**

TÉMAVEZETŐ: Dr. Gesztelyi Rudolf

DEBRECENI EGYETEM  
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA  
DEBRECEN, 2011.

*Egy egyenlet az örökkévalóság egy darabja*

*(An equation is something for eternity)*

*Albert Einstein*

# Tartalomjegyzék

|                                                                                               |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Bevezetés és célkitűzés.....</b>                                                        | <b>1</b>  |
| <b>2. Irodalmi áttekintés.....</b>                                                            | <b>5</b>  |
| 2.1. A receptoriális válaszkészség módszer (RRM).....                                         | 5         |
| 2.2. Az RRM eddigi alkalmazása biológiai mintán .....                                         | 9         |
| 2.3. A tengerimalac bal pitvari munkaizomzat adenozinerg rendszere .....                      | 11        |
| 2.3.1. Az adenosin metabolizmusa és transzportja .....                                        | 11        |
| 2.3.2. Az adenosin receptorai és jelátvitelük .....                                           | 12        |
| 2.3.3. A thyreoid hormonok befolyása az adenozinerg rendszerre .....                          | 13        |
| 2.3.4. Az adenosin-dezamináz (ADA) gátlás hatása az adenozinerg rendszerre .....              | 16        |
| 2.4. A koncentráció-hatás (E/c) görbék aszimmetriája.....                                     | 18        |
| 2.5. Kvantitatív receptor modellek.....                                                       | 19        |
| 2.5.1. A Hill-Langmuir egyenlet.....                                                          | 19        |
| 2.5.2. Az okkupációs modell .....                                                             | 21        |
| 2.5.3. Az agonizmus operatív modellje .....                                                   | 23        |
| 2.5.4. A Hill egyenlet.....                                                                   | 26        |
| 2.5.5. A céljainknak megfelelő modell kiválasztása.....                                       | 27        |
| <b>3. Anyagok és módszerek .....</b>                                                          | <b>29</b> |
| 3.1. A tiroxin-kezelés és az ADA gátlás hatásának ex vivo vizsgálata.....                     | 29        |
| 3.1.1. Oldatok.....                                                                           | 29        |
| 3.1.2. Állatok .....                                                                          | 29        |
| 3.1.3. In vivo kezelés .....                                                                  | 30        |
| 3.1.4. A bal pitvarok preparálása és előinkubációja .....                                     | 30        |
| 3.1.5. Adenosin E/c görbék.....                                                               | 31        |
| 3.1.6. In vitro kezelés .....                                                                 | 31        |
| 3.1.7. CPA E/c görbék .....                                                                   | 32        |
| 3.1.8. Inozin E/c görbék .....                                                                | 32        |
| 3.1.9. Beválasztási kritériumok .....                                                         | 33        |
| 3.1.10. A kontrakciós erő és E/c görbe adatok feldolgozása.....                               | 33        |
| 3.1.11. Statisztikai elemzés .....                                                            | 34        |
| 3.2. Az agonista- és rendszer-tulajdonságok hatásának in silico vizsgálata .....              | 34        |
| 3.2.1. Torzítatlan, egyagonistás E/c görbék szerkesztése .....                                | 35        |
| 3.2.2. A Hill és a Richards egyenlet illesztése a torzítatlan, egyagonistás E/c görbékre..... | 36        |

|                                                                                                                                        |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.3. Torzítatlan, kétagonistás E/c görbék szerkesztése .....                                                                         | 37        |
| 3.2.4. A kétagonistás E/c görbék torzítása .....                                                                                       | 39        |
| 3.2.5. Az RRM két egyenletének illesztése a torzult, kétagonistás E/c görbékre .....                                                   | 39        |
| 3.2.6. Számítógépes szimuláció és adatelemzés .....                                                                                    | 41        |
| <b>4. Eredmények .....</b>                                                                                                             | <b>42</b> |
| 4.1. Az ADA gátlás hatása az A <sub>1</sub> receptor mediálta negatív inotrópiára eu- és hyperthyreoid tengerimalac bal pitvaron ..... | 42        |
| 4.1.1. Thyreoid státusz .....                                                                                                          | 42        |
| 4.1.2. Kiindulási kontrakciós erők .....                                                                                               | 42        |
| 4.1.3. Adenozin és inozin E/c görbék .....                                                                                             | 43        |
| 4.1.4. CPA E/c görbék .....                                                                                                            | 44        |
| 4.2. Az affinitás, a jelátviteli hatékonyság és az operatív meredekségi tényező befolyása az RRM becsléseinek pontosságára .....       | 46        |
| 4.2.1. A szimulált agonisták torzítatlan, egyagonistás E/c görbéi .....                                                                | 46        |
| 4.2.2. Az RRM becslései a teszt agonista és a torzító agonista azonossága esetén .....                                                 | 47        |
| 4.2.3. Az RRM becslései a teszt agonista és a torzító agonista különbözősége esetén .....                                              | 50        |
| 4.2.4. A E/c görbe aszimmetria figyelembevételének hatása az RRM becsléseire ...                                                       | 54        |
| <b>5. Megbeszélés .....</b>                                                                                                            | <b>64</b> |
| 5.1. A thyreoid hormonok és az ADA gátlók interakciója a tengerimalac bal pitvari adenozinerg rendszeren .....                         | 64        |
| 5.2. Az agonisták és receptoriális rendszerek tulajdonságainak befolyása az RRM megbízhatóságára .....                                 | 69        |
| 5.3. Új eredmények .....                                                                                                               | 76        |
| <b>6. Összefoglalás .....</b>                                                                                                          | <b>77</b> |
| <b>7. Summary .....</b>                                                                                                                | <b>78</b> |
| <b>8. Irodalom .....</b>                                                                                                               | <b>79</b> |
| 8.1. A disszertáció elkészítéséhez felhasznált irodalom .....                                                                          | 79        |
| 8.2. A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények .....                                                                               | 87        |
| 8.3. A PhD értekezés témájához kapcsolódó posztterek és absztraktok .....                                                              | 88        |
| <b>9. Tárgyszavak .....</b>                                                                                                            | <b>89</b> |
| <b>10. Köszönetnyilvánítás .....</b>                                                                                                   | <b>90</b> |
| <b>11. Függelék .....</b>                                                                                                              | <b>91</b> |

# 1. Bevezetés és célkitűzés

A soksejtű élőlények sajátossága, hogy a sejtek közötti tér speciális „belső környezetet” (milieu interieur) képez, amely összetételében eltér mind a külső környezettől, mind az intracelluláris kompartmentektől. Az élőlények belső környezetének kialakulását és fenntartását (homeosztázis) számos, a belső környezetbe juttatott endogén szabályozó anyag biztosítja, melyek többsége farmakológiai értelemben receptor agonistának tekinthető.

A sejtműködés változásának mértéke, sőt bizonyos esetekben a jellege is függ az agonisták interstitialis koncentrációjától, amelynek fontos szabályozó szerepe van. Egy agonista koncentrációja és a kiváltott hatás közötti kapcsolatot - a molekuláris biológia és a génterápia korában is - a legpontosabban koncentráció-hatás (E/c) görbe felvételével lehet meghatározni (Kenakin 2006). A E/c görbe kiértékelésekor kritikus jelentőségű, hogy a koncentráció, amelyhez a hatást rendeljük, mely kompartmentre vonatkozik, ez ugyanis meghatározza, hogy a E/c görbe miről ad információt. Ideális esetben a figyelembe vett (ritkábban mért, legtöbbször számolt) agonista koncentráció a receptorok mikrokörnyezetére vonatkozik, vagyis a E/c görbe (az agonistán túl) a receptort illetve a posztreceptorális jelátviteli utakat jellemzi, és nem függ lényegesen a receptorokat tartalmazó szövet egyéb jellemzőitől (mint például az agonista diffúziójának helyi sajátosságai vagy az agonistát átalakító enzimek aktivitása).

Számos esetben azonban az adott agonista koncentrációjáról nem rendelkezünk megbízható információval specifikus kötődésük helyén. Ez különösen igaz a bomlékony agonistákra, melyek koncentrációját igen nehéz meghatározni receptoraik közelében, főleg működésben levő, mozgó szövetben. A receptorközei koncentráció ismerete ugyanakkor fontos lenne az agonisták által befolyásolt biológiai folyamatok pontos feltérképezéséhez.

Egy a munkacsoportunk által a közelmúltban kifejlesztett eljárás, a receptorális válaszkészség módszer (receptorial responsiveness method; a továbbiakban: RRM) alkalmas lehet a probléma megoldására, vagyis bomlékony agonisták esetében a receptorközei koncentráció (pontosabban egy jól definiált állapothoz képesti koncentráció-növekedés) becslésére működő szövetben. A

jelenség, amelyen az RRM alapul, a következő: ha egy E/c görbét úgy veszünk fel, hogy a receptorok környezetében már előzőleg is jelen volt az adott agonista (vagy a receptor egy másik agonistájának) egy bizonyos (nullától különböző) koncentrációja, amelyet a E/c görbe kiértékelésekor figyelmen kívül hagyunk, akkor a kapott hatások lefelé torzulnak (kisebbek lesznek a valós hatásoknál). Az RRM egy kétváltozós, egyparaméteres nemlineáris regresszió, melynek során egy a munkacsoport által fejlesztett egyenletet illesztünk a fenti körülmények között felvett E/c görbére. Az RRM-mel megbecsült paraméter vagy magát a keresett extra koncentrációt adja meg, vagy egy másik agonista azzal ekvieffektív koncentrációját (Gesztelyi és mtsai, 2004; Karsai és mtsai, 2006). Ez a két lehetőség azért áll fenn, mert annak az agonistának, amellyel a E/c görbe fel lett véve (teszt agonista), nem kell feltétlenül azonosnak lennie azzal az agonistával, amelynek meg akarjuk határozni a receptorközelbeli extra koncentrációját (torzító agonista).

Ha a teszt és a torzító agonista ugyanaz, az RRM közvetlenül becsli a torzító agonista koncentrációját. Ha nem, az RRM azt a teszt agonista koncentrációt adja meg, amelyik egyenlő hatást képes kifejezni a torzító agonista koncentrációval (Gesztelyi és mtsai, 2004). A teszt agonista stabilitása és jó diffúziós készsége nagyban növeli a meghatározás pontosságát. Ebből következően az, hogy az RRM megengedi a torzító és a teszt agonista különbözőségét, lehetővé teszi, hogy stabil agonisták felhasználásával bomlékonyságuk miatt nehezen meghatározható agonisták koncentrációiról szerezzünk információt, még hozzá egy olyan nehezen megközelíthető szöveti kompartmentben, mint amilyen a receptorok mikrokörnyezete (Gesztelyi és mtsai, 2004; Karsai és mtsai, 2006).

A jelen disszertáció első vizsgálatában az RRM-et nem koncentráció-meghatározásra használtuk fel, hanem elméleti segédeszközként szolgált egy *in vitro* (de még inkább *ex vivo*-nak tekinthető) módszerrel kapott kísérleti eredmény interpretálásában. Eu- és hyperthyreoid tengerimalac bal pitvaron az adenosin-dezamináz (ADA) gátlásának hatását vizsgáltuk az A<sub>1</sub> adenosin receptor (az A<sub>1</sub> receptor) negatív inotróp válaszkészségére. Az ADA gátlása azonban növeli az interstitialis adenosin koncentrációt, a többlet adenosin pedig torzító agonistaként viselkedik, ha az A<sub>1</sub> receptor válaszkészségét az ADA gátlásával egyidejűleg

vizsgáljuk. Következésképp, az ADA gátlás hatása egy  $A_1$  receptor agonistával felvett E/c görbére a következő komponensekből áll:

1. Az  $A_1$  receptor válaszkészségének látszólagos csökkenése, amely a többlet adenozin miatt elkerülhetetlenül fellép.

2. Az  $A_1$  receptor válaszkészségének látszólagos növekedése az adott agonista eliminációjának gátlása miatt. Ez a hatás akkor számottevő, ha egyébként a gátolatlan ADA az agonistát kellően nagy sebességgel tudja bontani. ADA rezisztens agonista alkalmazásával ez a komponens kiejthető.

3. Az ADA gátlás esetleges hatása az  $A_1$  receptor abszolút válaszkészségére. A jelen disszertáció első vizsgálatának célja ennek a komponensnek a felderítése volt. A mérési eredmények korrekt interpretálásához azonban feltétlenül szükséges az első két komponens figyelembe vétele is, amely az 1. komponens esetében feltételezi az RRM elvének szem előtt tartását.

Noha az eddigi kísérletes tapasztalatok arra mutatnak, hogy az RRM jól használható a torzító és a teszt agonista különbözősége esetén is (Gesztelyi és mtsai, 2004), mégis felmerül a kérdés, hogy a két agonista eltérő tulajdonságai (pl. a receptorhoz való affinitás és az efficacy, vagyis a receptorhoz való kötődés utáni hatáskiváltó képesség) mennyiben érintik az RRM által szolgáltatott eredmények megbízhatóságát. Ennek a kérdésnek a tisztázása - elméleti érdekességén túl - gyakorlati jelentőséggel is bírhat, hiszen az RRM - bizonyos feltételek teljesülése esetén - egyedülálló lehetőséget ad a soksejtű szervezetek szabályozó működéseinek mennyiségi szempontú vizsgálatára a szabályozás célszöveiteiben.

A jelen disszertáció második vizsgálata során tehát célunk az RRM segítségével kapható becslések megbízhatóságának vizsgálata volt eltérő tulajdonságú torzító és a teszt agonisták esetén. Ezen túl tanulmányozni kívántuk az agonisták hatását mediáló rendszer jellegének befolyását is. Arra törekedtünk, hogy a kérdéses jelenséget minél „tisztábban”, zavaró körülményektől mentesen vizsgálhassuk. Ehhez a legmegfelelőbbnek a számítógépes szimulációt találtuk, amelyben egy megfelelően részletes kvantitatív receptor modell segítségével előállíthatóak a vizsgálni kívánt helyzetek, kivitelezhető az RRM (ugyanúgy, mintha biológiai adatokat elemeznénk), majd a kapott becslések összevethetőek a szimuláció input adataival.

Második, *in silico* vizsgálatunkat három szakaszra bontottuk. Az első szakaszban a torzító koncentráció (a torzító agonista extra koncentrációja) nagyságának és a farmakológiai rendszer jellegének befolyását tanulmányoztuk az RRM pontosságára, ezért a torzító és a teszt agonistát azonosnak vettük. A második szakaszban a torzító és a teszt agonista különbözőségének hatását vizsgáltunk, ezért eltérő affinitású és hatáslétrehozó képességű (efficacy) torzító és teszt agonistákat szimuláltunk. A harmadik szakaszban a szimulált E/c görbék aszimmetriájának hatását kívántuk feltárni. Ehhez az RRM addig használt egyenletét kibővítettük egy szimmetria tényezővel, majd összehasonlítottuk a régi és az új egyenlet illesztésével kapott becsléseket.

A jelen értekezést megalapozó vizsgálatok tehát a következő kérdések megválaszolását célozták:

1. Hogyan befolyásolja az ADA gátlása egy ADA rezisztens A<sub>1</sub> receptor agonista hatását eu- és hyperthyreoid tengerimalac bal pitvaron?
2. Hogyan befolyásolják a torzító agonista koncentrációja és a receptort hordozó rendszer tulajdonságai az RRM pontosságát?
3. Hogy befolyásolja a torzító és a teszt agonista egymástól eltérő affinitása és kötődés utáni hatáskiváltó képessége (efficacy) az RRM pontosságát?
4. Hogyan befolyásolja a E/c görbék aszimmetriájának figyelembe vétele az RRM pontosságát?

## 2. Irodalmi áttekintés

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

Legyen adott egy biológiai rendszer és egy agonista, amelyik szelektíven izgatja a rendszerben található egyik receptorpopulációt. Ha az adott agonista azonos dózisait ismételten mérjük be a rendszerbe, 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. Ezt a csökkenő válaszkészséget az aktuális dózisokkal szemben azért tapasztaljuk, mert a korábbi dózisok a receptorok egy részének lefoglalása és azokon hatás létrehozása révén egyre nagyobb részét „használják el” a rendszer funkcionális kapacitásának (válaszkészségének), így az aktuális dózis kisebb szabad receptorpopulációhoz kötődhet és kisebb funkcionális kapacitás áll a rendelkezésére.

Ez a jelenség felületesen emlékeztet a receptoriális deszenzitizációra, de attól teljesen független. Deszenzitizáció esetén a nyugalmi állapotú (szabad kötőhelyű) receptorral interakcióba lépő agonista hoz létre a korábbinál kisebb hatást, a fenti esetben viszont azért mérünk csökkent választ, mivel nem vesszük figyelembe a jelenlévő agonista mennyiségének egy részét, illetve annak hatását. Vagyis, olyan rendszerben regisztrálunk csökkent választ, amely nyugalmi állapotában az adott agonista dózistra szokásos nagyságú választ képes adni.

A E/c görbék kiértékelése során a receptorok aktivációját (és annak minden következményét) általában annak az exogén agonistának tulajdonítják, amellyel az adott E/c görbét felvették. Ha van is jelen a receptorok közelében más, pl. egy endogén agonista, azt rendszerint figyelmen kívül hagyják. Kis „extra” agonista mennyiség torzító hatása valóban elhanyagolható. Ha azonban az adott rendszer ezt a többlet agonistát olyan koncentrációban tartalmazza, amely jelentős mértékben képes stimulálni a receptorokat (és ezáltal „elhasználni” azok válaszkészségének egy jelentős részét), akkor az adott rendszerben az extra agonista jelenlétében felvett E/c görbe már elhanyagolhatatlan mértékben torzul.

Munkacsoportunk korábban leírta az összefüggést a torzult és a torzulatlan (korrekt kiértékelés esetén kapható) hatás között (Gesztelyi és mtsai, 2004):

$$E' = 100 - \frac{100 \cdot (100 - E)}{100 - E_{bias}} \quad 2.1.$$

ahol:  $E'$  - a torzult hatás;  $E$  - a torzítatlan hatás;  $E_{bias}$  - a torzító agonista koncentráció ( $c_{bias}$ ) által kiváltott hatás (amely figyelmen kívül lett hagyva a torzult hatás meghatározása során).

Fontos, hogy az  $E$  és az  $E_{bias}$  torzítatlan hatások, tehát kifejezhetők bármely olyan jól ismert összefüggésből, ami kapcsolatot teremt a receptorális hatás és a hatást létrehozó agonista koncentráció között. Mivel az egyik legegyszerűbb és legáltalánosabb ilyen összefüggés a Hill egyenlet (ld. később: 2.13. és 3.2. egyenletek), az RRM kifejlesztése során ez került felhasználásra, tehát a hatás az agonista koncentrációjára és a Hill egyenlet paramétereire ( $E_{max}$ ,  $EC_{50}$ ,  $n$ ) lett visszavezetve. Így módon a Hill egyenlet és a 2.1. egyenlet kombinációjával kifejezhető a kapcsolat a torzító agonista koncentrációja ( $c_{bias}$ ) és a torzult hatás ( $E'$ ) között (Gesztelyi és mtsai, 2004).

A fentiekben a legegyszerűbb esetet ismertettünk, amelyben a torzító agonista és a teszt agonista (amellyel a  $E/c$  görbe fel lett véve) ugyanaz a vegyület. Úgy véljük azonban, hogy a torzító és a teszt agonista azonossága nem feltétele annak, hogy a fenti összefüggést haszonnal alkalmazzuk. Ezt abból kiindulva gondoljuk, hogy az azonos sejtválaszt létrehozó agonisták hatásai - legalábbis részben - ugyanazokon a struktúrákon (receptorok, posztreceptorális jelátviteli elemek) összegződnek, amelyek válasz-kapacitása limitált. Ebből kiindulva elegendőnek látszik, ha csak arra törekszünk, hogy a teszt agonista jelátvitel minél nagyobb mértékben átfedjen a torzító agonistáéval. Ha az agonisták esetleges különbözőségét figyelembe kívánnánk venni, az nagyon megbonyolítaná a  $c_{bias}$  és  $E'$  kapcsolatára felírt összefüggést. Annak érdekében tehát, hogy két, esetlegesen különböző agonista szimultán hatását a lehető legegyszerűbb módon tudjuk kezelni, a fenti összefüggés levezetésekor a  $c_{bias}$  a teszt agonista ekvиеffektív koncentrációjával ( $c_x$ ) lett helyettesítve. Ez formailag

megegyezik azzal az összefüggéssel, ami a két agonista azonosságából indul ki (Gesztelyi és mtsai, 2004; Karsai és mtsai, 2006). A  $c_{bias}$  és  $E'$  közötti összefüggést használja fel az RRM, amely a  $E/c$  görbe torzulásából, vagyis az  $E$  és az  $E'$  közötti eltérésből kvantifikálja a torzító agonista koncentrációját (Gesztelyi és mtsai, 2004).

Ha egy endogén agonista rövid féléletidővel bír, nehéz bármilyen kvantitatív információhoz jutni vele kapcsolatban. Ha azonban lehetőségünk van az adott rendszerben az endogén agonista felszabadulása előtt és után egy-egy  $E/c$  görbét felvenni egy megfelelően hasonló agonistával, a két  $E/c$  görbe közötti különbség (vagyis a második görbe torzulása) információt fog hordozni a kérdéses endogén agonista koncentrációjáról. Ez az információ kinyerhető, ha a torzító koncentráció és a  $E/c$  görbe torzulás közötti összefüggést (mint regressziós függvényt) a második  $E/c$  görbe adataira illesztjük. A függvénynek tartalmaznia kell a teszt agonista koncentrációja és ennek hatása közötti torzítatlan kapcsolat paramétereit, melyeket az első  $E/c$  görbéből nyerhetünk ki, ugyancsak regresszióanalízissel. Ha ez utóbbi regresszió során a Hill modellt illesztjük, ezek a paraméterek az  $E_{max}$ ,  $EC_{50}$  és  $n$  lesznek, de elvben bármely modell használható, amely kvantitatív összefüggést ad meg az agonista koncentrációja és a kiváltott hatás között. A fentiekből következően a módszer által szolgáltatott becslés a torzító agonista koncentrációjában beállt változás lesz, amely a két  $E/c$  görbe felvétele között eltelt időben alakult ki (Gesztelyi és mtsai, 2004; Karsai és mtsai, 2006).

Az RRM egyenlete, vagyis a torzult hatás a teszt agonista koncentráció függvényében:

$$E' = 100 - \frac{100 \cdot \left( 100 - E_{max} \cdot \frac{(c_x + c_{test})^n}{(c_x + c_{test})^n + EC_{50}^n} \right)}{100 - E_{max} \cdot \frac{c_x^n}{c_x^n + EC_{50}^n}} \quad 2.2.$$

ahol:  $c_x$  - a  $c_{bias}$  RRM általi becslése;  $E'$  - a torzult válasz (a  $c_{bias}$  figyelmen kívül hagyásával számított hatás);  $c_{test}$  - a  $E/c$  görbe felvétele során bemért agonistaközpontosság;  $E_{max}$ ,  $EC_{50}$  és  $n$  - az intakt ( $c_{bias} = 0$ )  $E/c$  görbének a Hill

egyenlet illesztésével nyert paraméterei (az intakt E/c kapcsolat leírói). A görbeillesztés stabilitása, valamint a számolt konfidencia intervallumok korrektsége érdekében a koncentrációt jelentő mennyiségeket logaritmikus formában érdemes kifejezni a görbeillesztésre használt egyenletekben (Motulsky és Christopoulos, 2003). A 2.2. egyenletben rögzített összefüggést ezért minden esetben logaritmikus formában kifejezett koncentrációkkal illesztettük (ld.: 3.8. egyenlet).

A fentiekkel összhangban az RRM sikeres alkalmazásának több feltétele is van, amelyek teljesülése befolyásolja a meghatározás pontosságát (Gesztelyi és mtsai, 2004; Karsai és mtsai, 2006):

1. A receptoriális hatást nagy pontossággal kell tudni mérni.
2. A  $c_{bias}$  nem változhat lényegesen a (második) E/c görbe felvétele során.
3. A teszt agonistának stabilnak és jól penetrálónak kell lennie.
4. A meghatározandó  $c_x$ -nek (vagyis a  $c_{bias}$ -szel ekvieffektív teszt agonista koncentrációnak) a teszt agonistával felvett natív (torzítatlan) E/c görbén - szemilogaritmikus ábrázolás mellett - az alsó és felső görbület közötti kvázi lineáris szakaszra kell esnie. (Szerencsére ez a rész rendszerint több nagyságrendre kiterjed és magába foglalja az adott receptor működése szempontjából legfontosabb koncentráció-tartományt.)
5. A meghatározás alatt a receptorok érzékenysége (tényleges válaszadási készsége) nem változhat. Mivel agonista (főleg full agonista) tartós expozíciója esetén a receptorok deszenzitizálódnak (típusuktól függően hosszabb vagy rövidebb idő alatt), az RRM alkalmazási köre általánosságban az akut koncentrációváltozásokra szűkül le. Ez a feltétel azonban magában hordja az RRM egy másik hasznosítási lehetőségét: ha egy többlet agonistát tartalmazó rendszer válasza nem követi a 2.2. egyenletben rögzített összefüggést (noha a többi feltétel mind teljesül), az a receptorok érzékenységének változására utal. Ez alapján nem csak a receptor (illetve a jelátviteli utak) deszenzitizációja mutatható ki, hanem egy esetleges szenzitizáció (válaszkészség-fokozódás) is. A jelen értekezést megalapozó vizsgálatok közül az elsőben ezt a lehetőséget használtuk ki.
6. A torzító és a teszt agonista farmakodinámiás tulajdonságai minél jobban hasonlítanak egymásra. A jelen értekezés második, *in silico* vizsgálatának egyik célja e feltétel szigorúságának felderítése volt.

## 2.2. Az RRM eddigi alkalmazása biológiai mintán

Az RRM-et munkacsoportunk eddig a tengerimalac bal pitvar adenozinerg mechanizmusainak tanulmányozására használta. Ezt egyrészt a tengerimalac pitvari inotrópia adenozinerg szabályozásának speciális vonásai magyarázzák, másrészt az, hogy az izolált, ingerelt bal pitvar kontrakciós ereje könnyen és megbízhatóan mérhető mint receptoriális hatás. A vizsgálat tárgya a transzszarkolemmális adenozin transzport volt, továbbá az, hogy a hyperthyreosis hogyan befolyásolja a transzport irányát illetve intenzitását. Tengerimalac bal pitvaron az ekvilibratív nukleozid transzportot gátló dipyridamol illetve nitrobenzylthioinosine (NBTI) interstitialis adenozin akkumulációt okozott, amely (a nyugalmi interstitialis adenozin koncentráción felül) mintegy 15-25 nM CPA-val ( $N^6$ -cyclopentyladenosine; szelektív  $A_1$  receptor agonista) volt ekvielektív (Karsai és mtsai, 2006). Ezt az interstitialis adenozin felhalmozódást egy előzetes 8 napos tiroxin-kezelés mintegy megkétszerezte, az extra adenozin koncentráció (NBTI jelenlétében) 37 nM CPA-val volt ekvielektív (Karsai és mtsai, 2007).

A fenti munkák során az RRM igényeit (ld.: a 2.1. alfejezet vége) a preparátum, az  $A_1$  receptor és a kísérleti kérdésfelvetés alábbi sajátosságai elégítették ki:

*Ad 1.* A regisztrált hatás a pitvari kontrakciós erő volt. Az  $A_1$  receptor robusztus és nagy pontossággal mérhető negatív inotrop hatást hoz létre szívizmon, ezért a kontrakciós erő detektálása alkalmas az  $A_1$  receptorfunkció vizsgálatára (Gesztelyi és mtsai, 2003a, 2003b, 2004). A pitvarszövet különösen megfelel ennek a célnak, ugyanis pitvaron az  $A_1$  receptor agonisták a nyugalmi kontrakciós erőt is erőteljesen csökkentik, szemben a kamrával, ahol csak a pozitív inotróp anyagok hatását ellensúlyozzák (Kurachi és mtsai, 1986).

*Ad 2.* Az ekvilibratív nukleozid transzport gátlása során a  $C_{bias}$ , vagyis a többlet interstitialis adenozin koncentráció viszonylagos állandósága úgy biztosítható, hogy az inhibitor adása után kivárjuk az új egyensúly beállását, amit a kontrakciós erő stabilizálódása jelez (Gesztelyi és mtsai, 2003a, 2003b).

*Ad 3.* A használt koncentrációtartományban vízdékony, relatíve kis molekulájú CPA hatása lassabban alakul ki, mint az adenoziné, de tartósan

fennmarad, mivel vértelen pitvarszövetben csak igen lassan bomlik (Gesztelyi és mtsai, 2004). Ezzel összhangban a CPA megoszlását a nukleozid transzport gátlása nemigen befolyásolja (szemben a gyors turnover-ű adenzinnal).

*Ad 4.* Az adenzin és a CPA egyaránt teljes („full”) agonistái az  $A_1$  receptornak, natív (torzítatlan) E/c görbék kvázi lineáris szakaszán az ekvielektív koncentrációk széles tartományban átfednek (Gesztelyi és mtsai, 2003b, 2004).

*Ad 5.* Az  $A_1$  receptorok hosszabb ideig (órákig, sőt napokig) tartó, full agonistával való stimuláció mellett sem deszenzitiválódnak lényegesen (Longabaugh és mtsai, 1989; Baker és mtsai, 2000).

*Ad 6.* Egy receptor funkcionális kapacitását minden agonistája „fogyasztja”, sőt, az eltérő típusú receptorokhoz kötődő, de azok izgatása révén ugyanazokat a jelátviteli utakat használó agonisták is kölcsönösen csökkentik egymás receptorainak funkcionális kapacitását (szimultán stimuláció esetén). Ez alapján racionális feltételezés volt az RRM-mel végzett vizsgálataink során, hogy a torzító és a teszt agonista különbözősége nem rontja le nagymértékben a becslések pontosságát, amennyiben a szignáltranszdukció azonos vagy jelentősen átfed. Ezt támasztotta alá, hogy metakolin (acetyl- $\beta$ -methylcholine; relatíve lassan bomló muszkarin receptor agonista) ismert koncentrációi jól meghatározhatónak bizonyultak CPA mint teszt agonista segítségével izolált tengerimalac bal pitvaron (a regresszióval kapott ekvielektív CPA koncentrációkat torzítatlan metakolin illetve CPA E/c görbék adatai alapján számították át metakolin koncentrációkra) (Gesztelyi és mtsai, 2004).

Ismert azonban, hogy a receptorok működési sajátosságai nem függetlenek az alkalmazott agonistától. A különböző agonisták hatásai, pl. efficacy értékei különbözhetnek még ugyanazon receptor teljes agonistái esetében is, ami a E/c görbék eltérő karakterisztikájában nyilvánul meg (Dhalla és mtsai, 2003). Ebből következően, noha a torzító és a teszt agonista különbözősége nem akadályozza az RRM kivitelezését, a kapott becslések magukon viselhetik a torzító és a teszt agonista egyes eltérő tulajdonságainak hatását. A jelen disszertációhoz felhasznált *in silico* vizsgálatok elsősorban e probléma tisztázásához kívántak hozzájárulni.

## 2.3. A tengerimalac bal pitvari munkaizomzat adenozinerg rendszere

### 2.3.1. Az adenzin metabolizmusa és transzportja

Az adenzin adeninből és ribózból álló nukleozid, amely az élő szervezet legfontosabb primer energiatároló molekulájának, az ATP-nek a prekuzora és egyben bomlásterméke. Fiziológias körülmények között az adenzin mind az extra-, mind az intracelluláris térben folyamatosan termelődik és eliminálódik (Deussen, 2000a, 2000b; Fredholm és mtsai, 2001).

Extracellulárisan az adenzin a sejtekből kijutott adenin nukleotidok (ATP, ADP, AMP, cAMP) bomlása révén keletkezik, a folyamat sebesség-meghatározó lépése az AMP - adenzin átalakulás, melyet ekto-nukleotidázok, főleg az ekto-5'-nukleotidáz (CD73) és az ekto-apiráz (CD39) katalizálnak.

Intracellulárisan az adenzin zöme AMP-ből keletkezik, főleg az endo-5'-nukleotidáz, kisebb részben alkalikus foszfátázok révén. Az adenzin kisebb részét az S-adenozil-homocisztein-hidroláz (SAH-hidroláz) állítja elő S-adenozil-homociszteinből (SAH).

Az interstitialis adenzin eliminációja három úton történhet: kimosódással a keringés révén, extracelluláris adenzin-dezamináz (ADA) általi bontással és membranális transzporttal az adott szövet sejtjeibe. Az extracelluláris ADA általi dezaminálás általában alárendelt jelentőségű, tengerimalac szívben pedig különösen az, mivel itt ADA csak intracellulárisan fordul elő (Schutz és mtsai, 1981). Az adenzin dezaminációja során keletkező inozin az adenzinéra emlékeztető kardioprotektív hatással rendelkezik (Szabó és mtsai, 1986).

Az intracelluláris adenzin egy részét az adenzin-kináz AMP-vé alakítja, másik részét az intracelluláris ADA inozinná dezaminálja. (A fentieket részletesen ld.: Sommerschild és Kirkebøen, 2000; Deussen, 2000a, 2000b; Fredholm és mtsai, 2001; Headrick és mtsai, 2003.)

A sejtek membránjában kétféle, ekvibratív (ENT) és koncentratív (aktív transzportra képes; CNT) nukleozid transzporter fordulhat elő. A szívben döntően ENT található, azon belül is ENT1, ami ekvibratív és nitrobenzylthioinosine (NBTI)

szenzitív, vagyis NBTI-vel gátolható (Conant és Jarvis, 1991, 1994). Ennek megfelelően cardiomyocytaon a nukleozid transzport irányát és intenzitását elsődlegesen a membrán két oldala közötti adenosin koncentráció-különbség szabja meg (Deussen és mtsai, 1999).

### 2.3.2. Az adenosin receptorai és jelátvitelük

Az adenosin azon hatásait, amelyeket nem mint a nukleinsav-anyagcsere metabolitja fejt ki, döntően specifikus receptorok közvetítik, melyeket legnagyobb affinitású fiziológiás ligandjuk alapján adenosin receptoroknak neveztek el. A Nemzetközi Farmakológiai Társaság (IUPHAR) jelenleg három adenosin receptor típust tart nyilván, az  $A_1$ ,  $A_2$  (ezen belül  $A_{2A}$  és  $A_{2B}$  altípust), illetve  $A_3$  receptort. Ezeket először farmakológiai módszerekkel különítették el (típus- illetve altípus-szelektív agonistákkal és antagonistákkal), azután klónozták az egyes molekulákat. Valamennyien a citoplazmatikus membránban helyet foglaló hét transzmembrán doménnal rendelkeznek, G-proteinhez kapcsolnak, kötőhelyük az interstitium felé néz (összefoglalóként ld.: Fredholm és mtsai, 2001). A szakirodalomban fellelhető egy negyedik adenosin receptor típus is ( $A_4$ ) (Cornfield és mtsai, 1992), ám ezt eddig még nem sikerült klónozni (összefoglalóként ld.: Sommerschild és Kirkeboen, 2000; Hutchinson és Scammells, 2004).

Az adenosin kiterjedt parakrin és autokrin funkciói közül kiemelkedik a szív működés patológias körülmények közötti szabályozása. A myocardiumon az  $A_1$  és  $A_3$  típusoknak, a szív ereiben pedig az  $A_{2A}$  altípusnak van jelentősége.

A jelen disszertációban tárgyalt *ex vivo* kísérleteket tengerimalac pitvaron végeztük, amelyben a cardiomyocyta csak  $A_1$  receptort expresszálnak (Gardner és Broadley, 1999). Mivel állandó frekvencián ingerelt bal pitvart használtunk, az  $A_1$  receptor negatív tróp hatásai csak a kontrakciós erő csökkentésében nyilvánulhattak meg. Ennek megfelelően munkánk során ezt a kimeneteli változót regisztráltuk, mint hatást.

Tengerimalac pitvari munkaizomsejteken az  $A_1$  receptor agonisták negatív inotróp hatásának egyik útvonala az ún. muszkarin aktiválta  $K^+$  csatornák ( $K_{Ach/Ado}$ ) nyitása (Kurachi és mtsai, 1986). A másik útvonal az adenilcikláz gátlása, ami a

cAMP-szint csökkentésén keresztül csökkenti a protein-kináz A aktivitását. A protein-kináz A általi foszforiláció mérséklése egyrészt gátolja a szarkoplazmatikus retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-ázát (SERCA) és az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornát ( $\text{L}_{\text{Ca}}$ ), másrészt foszfoprotein foszfatázokat aktivál, ami hozzájárul a cAMP-dependens foszforiláció további visszaszorításához (Jahnel és mtsai, 1992; Gupta és mtsai, 1993; Neumann és mtsai, 1995). A fenti történések valamennyien csökkentik a citoszól szabad  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációját az akciós potenciál platófázisában, ami gyengíti a kontrakciós erőt.

A pitvari  $\text{A}_1$  receptor stimulációjának jellegzetessége, hogy a cAMP intracelluláris szintjétől függetlenül markáns hatást produkál, amit „direkt” hatásnak neveznek. Kamrán az  $\text{A}_1$  receptor agonisták csak „indirekt” hatást produkálnak, azaz fokozott adenilcikláz működés esetén képesek hatni, melynek során azt a nyugalmi érték irányába viszik, de az alá nem (a legtöbb speciesz esetében, a vadászgörény például kivétel). Ez az indirekt hatás pitvaron is létrehozható, fokozott adenilcikláz működés mellett a pitvari  $\text{A}_1$  receptor válaszkészsége is nagyobb. Feltételezik, hogy a direkt hatás háttérében a  $\text{K}_{\text{Ach/Ado}}$  aktivációja áll, mely csatorna nagy denzitásban található pitvaron, de csak elvétve fordul elő kamrán (összefoglalóként ld.: Belardinelli és mtsai, 1995; Shryock és Belardinelli, 1997).

Az adenosin intracelluláris kötőhelyekhez kapcsolódva is képes befolyásolni egyes fehérjék működését. Ilyen például az adenilciklázon található ún. P-site, melyhez kötődve az adenosin gyenge gátlást hoz létre az enzimen (Londos és Wolff, 1977; Tesmer és mtsai, 2000). A régebben nagyobb jelentőségűnek gondolt intracelluláris kötőhelyek szerepét napjainkban alárendeltnek tartják az adenosin receptorokéhoz képest.

### 2.3.3. A thyreoid hormonok befolyása az adenosinerg rendszerre

A tartósan jelenlévő thyreoid hormonok ( $\text{T}_3$ ,  $\text{T}_4$ ) csökkentik a myocardialis  $\text{A}_1$  receptor által mediált hatásokat, köztük a negatív inotróp hatást is (Szentmiklósi és mtsai, 1992; Kaasik és mtsai, 1994). Noha a jelenség mechanizmusa még nem minden részletében tisztázott, ismert, hogy az  $\text{A}_1$  receptor jelátvitelének több elemét is befolyásolják a thyreoid hormonok.

Az  $A_1$  receptorok száma változatlan marad (Bumgarner és mtsai, 1989) vagy enyhén emelkedik  $T_3$  és  $T_4$  tartós jelenlétében (El-Ani és mtsai, 1994; Kaasik és mtsai, 1994), ami nem magyarázza a válaszkészség csökkenését. Az  $A_1$  receptor ligandjaival szembeni affinitásában sem tapasztaltak változást hyperthyreosisban (El-Ani és mtsai, 1994), és a fenti vizsgálatok egyike sem talált a G-proteinek koncentrációjában szignifikáns eltérést.

Az adenilcikláz szintjében illetve aktivitásában egyes vizsgálatok fokozódást tapasztaltak (Pracyk és Slotkin, 1991; El-Ani és mtsai, 1994), mások mérséklődést (Bumgarner és mtsai, 1989). Mások szerint hyperthyreota patkány szívében az adenilcikláz mennyisége nem, de aktivitása csökken, ennek következtében a nagyobb  $\beta$ -receptorszám ellenére sem változik lényegesen a  $\beta$ -receptor agonisták hatása (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 foszfolambánnak (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, 1997; Seppet és mtsai, 1998; Shenoy és mtsai, 2001). A SERCA a pitvaron és a kamrán közel hasonló koncentrációban van jelen, de extra  $T_3$  illetve  $T_4$  hatására a pitvaron lényegesen nagyobb az expresszió fokozódása, mint kamrán. Thyreoid hormonok hatására a foszfolambán mennyisége pitvaron és kamrán egyaránt csökken (Shenoy és mtsai, 2001). Mindemellett hyperthyreota patkányban a nyugalmi kontrakciós erő amplitúdója csak a kamrán nőtt, a pitvaron változatlan maradt (Kaasik és mtsai, 1997), ami arra utal, hogy a foszfolambán-SERCA rendszer változásának pitvaron nincs jelentős szerepe a kontrakciós erőt illetően.

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  $L_{Ca}$  mennyiségének növekedését találták (Kreuzberg és mtsai, 2000), míg mások a csökkenését (Seppet és mtsai, 1993; Gøtzsche, 1994). A  $T_3$  és  $T_4$  fokozzák a ryanodine-szenzitív  $Ca^{2+}$ -csatorna („ryanodine receptor”) expresszióját is (Arai és mtsai, 1991).

Megemlítenéd, hogy kamrán a thyreoid hormonok a  $\beta$  típusú miozin nehézlánc ( $\beta$ -MHC) helyett az  $\alpha$ -MHC expresszióját serkentik, míg pitvaron a

thyreoid státusztól 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 cardiomyocytaikon a nukleozid transzport maximális kapacitása (Smolenski és mtsai, 1995). A nagyobb transzportkapacitás csökkenti az extracelluláris adenzin kapcsolódási esélyét a sejtfelszíni adenzin receptorokhoz, ami az adenzinnal szembeni válaszkészség csökkentésének irányában hat. A nukleozid transzport változása befolyásolhatja azoknak az exogén adenzin 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 adenzin receptor agonistákkal szembeni válaszkészség is csökken hyperthyreosisban (Szentmiklósi és mtsai, 1992), a fokozott nukleozid transzport kapacitás csak részben lehet felelős az adenzin gyengébb hatásáért hyperthyreota szívben.

Smolenski és mtsai (1995) az adenzin kináz (az intracelluláris adenzin fő eliminálója) aktivitásának növekedését tapasztalták hyperthyreosisban, igaz, a kisebb jelentőségű ADA aktivitásának csökkenésével együtt. A fokozott intracelluláris eliminációs kapacitás hozzájárulhat a hyperthyreosisbeli fokozott adenzin transzporthoz és ezáltal a bomlékony  $A_1$  receptor agonisták csökkent hatásához, de ez sem magyarázza a stabil analógok viselkedését (Szentmiklósi és mtsai, 1992).

Más adenzint metabolizáló enzim is érzékeny a thyreoid hormon-szintre, Smolenski és mtsai (1995) patkány szívben az ekto-5'-nukleotidáz (az extracelluláris adenzin-termelés kulcsenzime) aktivitásának csökkenéséről számoltak be, amely szerintük (az adenzin kináz fokozott működésével együtt) a hyperthyreoid myocardiumon interstitialis adenzin koncentráció csökkenést okozna. Újabb eredmények ezt nem erősítették meg, mások patkány cardiomyocytaikon az ekto-5'-nukleotidáz aktivitásának növekedését írták le  $T_3$  kezelés után, melynek hátterében az enzim mRNS-ének fokozott transzkripcióját mutatták ki (Carneiro-Ramos és mtsai, 2004).

A thyreoid hormonok tartós jelenléte tehát sokrétűen, de kellően nem tisztázott mértékben és módon befolyásolja a myocardialis adenzinerg rendszert.

Ez pedig annál is inkább fontos lenne, mivel újabb adatok arra mutatnak, hogy a thyreoid hormonok extra mennyisége a jól ismert kedvezőtlen hatásokon túl (tachycardia, hyperdynamias keringés, fokozott oxigén-felhasználás) az ischaemiás prekondicionáláshoz hasonló jellegű kardioprotektív hatást képes kifejteni (Pantos és mtsai, 2004).

#### *2.3.4. Az adenzin-dezamináz (ADA) gátlás hatása az adenzinerg rendszerre*

Az adenzin eliminációjának egyik lehetősége az ADA általi dezamináció, amely a szívben mennyiségi szempontból nem a legjelentősebb útvonal. Mindazonáltal az ADA gátlása szignifikánsan növeli az adenzin koncentrációját a szívben (Sandhu és mtsai, 1993; Silva és mtsai, 1995; Manthei és mtsai, 1998). Ezzel összhangban az ADA gátlása erősíti mind az endogén (Sandhu és mtsai, 1993; Manthei és mtsai, 1998), mind az exogén (Szentmiklósi és mtsai, 1982; Gesztelyi és mtsai, 2003a) adenzin által kiváltott válaszokat az adenzin ultrarövid (másodperces nagyságrendű) féléletidejének növelése révén.

Noha tengerimalac szívben az ADA csak intracellulárisan fordul elő (Schutz és mtsai, 1981), a cardiomyocyták számottevő ekvibratív nukleozid transzport kapacitása miatt (Conant és Jarvis, 1991) az ADA gátlása egyaránt emeli az intra- és az extracelluláris adenzin-szintet. A 2.2. egyenlet alapján azt várhatjuk, hogy ADA gátlás során az extracelluláris adenzin többlet (mint torzító agonista koncentráció) csökkenti a sejtfelszíni  $A_1$  receptorok látszólagos válaszkészségét, vagyis azt, amelyet egy exogén  $A_1$  receptor agonistával felvett E/c görbével detektálhatunk (ld.: 2.1. alfejezet). Ez a jelenség természetesen tettenérhetetlen, ha a válaszkészséget olyan  $A_1$  receptor agonistával vizsgáljuk, amelyet az ADA hatékonyan bont (pl. adenzin), mert ilyenkor a E/c görbe felvételéhez adott agonista bontásának gátlása nagyobb mértékben növeli a detektálható hatást, mint amennyire az előzetesen felhalmozódott endogén adenzin csökkenteni tudja (Gesztelyi és mtsai, 2003a). Ha azonban ADA rezisztens  $A_1$  receptor agonistát használunk, azt várjuk, hogy a felvett E/c görbe deprimált lesz az ADA gátlás nélkül felvett E/c görbéhez képest (vagyis  $E_{max}$ -a kisebb,  $EC_{50}$ -e nagyobb lesz).

Az előbbi gondolatmenettel szemben munkacsoportunk egy korábbi vizsgálatában azt tapasztalta, hogy az *erythro*-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine (EHNA; erőteljes ADA inhibitor) gyakorlatilag nem befolyásolta a CPA (szelektív, szintetikus A<sub>1</sub> receptor agonista) által kiváltott negatív inotróp választ izolált, ingerelt tengerimalac bal pitvaron. Sőt, hyperthyreoid tengerimalacokból származó pitvaron az EHNA szignifikánsan növelte a CPA-ra adott választ (Gesztelyi és mtsai, 2003b). E megfigyelés jelentőségét az adja, hogy a CPA rezisztens az ADA-ra (Pavan és IJzerman, 1998), vagyis koncentrációját nem befolyásolja az ADA gátlása. A CPA-ra adott válasz fokozódása az akkori vizsgálatban az EHNA cGMP-stimulálta 3',5'-ciklikus nukleotid foszfodiészteráz (PDE2) inhibitor tulajdonságának volt tulajdonítva (Gesztelyi és mtsai, 2003b). Mivel a PDE2 fő szubsztrátja a cAMP, a PDE2 gátlása révén az EHNA növeli a cAMP-függő foszforilációt, így az ezután alkalmazott CPA nem csak direkt, hanem indirekt jellegű adenzinerg hatást is ki tud váltani (amelyek összeadódva mint fokozott A<sub>1</sub> receptor válaszkészség mutatkoznak).

Másrészről viszont munkacsoportunk egy másik korábbi vizsgálatában az EHNA és a coformycin (az EHNA-val összemérhető hatékonyságú ADA inhibitor, PDE2 gátló hatás nélkül) hasonló módon befolyásolta az adenzin E/c görbáját izolált, ingerelt tengerimalac bal pitvaron (Gesztelyi és mtsai, 2003a). A szóban forgó vizsgálatban ENT1 típusú nukleozid transzport gátlók (dipyridamol, NBTI) és ADA inhibitorok (EHNA, coformycin) hatását hasonlították össze eu- és hyperthyreoid pitvaron felvett adenzin E/c görbékre. Azt találták, hogy míg az ENT1 gátlók az eu- és a hyperthyreoid pitvarokon hasonló mértékben csökkentették az EC<sub>50</sub>-et és nem befolyásolták az E<sub>max</sub>-ot, addig az ADA inhibitorok erőteljesebben csökkentették az EC<sub>50</sub>-et és növelték az E<sub>max</sub>-ot a hyperthyreoid pitvarokon, mint az euthyreoidokon. Ez felveti, hogy a hyperthyreoid A<sub>1</sub> receptorok fokozott érzékenysége EHNA jelenlétében (Gesztelyi és mtsai, 2003b) nemcsak a PDE2 gátlás következménye, hanem az ADA gátlásával is összefügghet.

A fenti kérdés tisztázásához egy PDE2 gátló hatás nélküli ADA inhibitor hatását kell megvizsgálni egy ADA rezisztens A<sub>1</sub> receptor agonista E/c görbéjére. Ennek megfelelően a jelen értekezéshez felhasznált *ex vivo* vizsgálat során az EHNA (potens ADA gátló és kevésbé potens PDE2 inhibitor) valamint a 2'-deoxycoformycin (DCF; potens és szelektív ADA inhibitor) hatását hasonlítottuk

össze CPA-val felvett E/c görbékre eu- illetve hyperthyreoid tengerimalac bal pitvaron.

## 2.4. A koncentráció-hatás (E/c) görbék aszimmetriája

Noha egy tipikus E/c görbe lineáris ábrázolás esetén derékszögű hiperbolához közelít, szemilogaritmikus ábrázolás mellett pedig szimmetrikus szigmoid lefutást mutat, a E/c görbék változatos alakokat vehetnek fel. Egy szemilogaritmikusán ábrázolt E/c görbe akkor szimmetrikus, ha a görbe középpontja (a maximális hatás felénél) és inflexiós pontja (ahol az előrefelé konvex alsó görbület átcsap a hátrafelé konvex felső görbületbe) egybeesik (Motulsky és Christopoulos, 2003).

A Hill egyenlet (ld.: 2.4., 2.13. és 3.2. egyenletek) által definiált függvény mindig szimmetrikus, ami a legtöbb esetben megfelelő illeszkedést biztosít a kísérletesen meghatározott E/c görbékre (Giraldo és mtsai, 2002). Az esetek kisebb részében azonban a Hill egyenlettel (vagy más, szimmetrikus függvényt definiáló egyenlettel) illesztett kísérletes adatok hamis eredményt adnak a E/c görbék aszimmetriája miatt (Van Der Graaf és Schoemaker, 1999). A E/c görbék aszimmetriáját figyelembe vevő egyenlet alkalmazásával, mint amilyen például a Hill egyenletből kifejlesztett Richards egyenlet (Richards, 1959; 3.3. egyenlet), ez a hiba kiküszöbölhető, igaz ennek ára van (a Richards egyenlet eggyel több regressziós paramétert tartalmaz, mint a Hill egyenlet, ami növeli az illesztés bizonytalanságát).

Az RRM egyenletében a jelen értekezés második vizsgálatának harmadik szakaszáig a Hill modell definiálta az agonista koncentráció és a hatás közötti kapcsolatot (2.2., 3.8. egyenletek). A 2.1. egyenlet és a Richards egyenlet kombinálása révén azonban az RRM továbbfejleszthető úgy, hogy az aszimmetrikus E/c görbéket is precízen kezelni tudja (ld. később: 3.9. egyenlet). A Hill modellen illetve a Richards modellen alapuló RRM megbízhatóságának összehasonlítása volt a jelen disszertáció *in silico* vizsgálatainak másik célja.

## 2.5. Kvantitatív receptor modellek

### 2.5.1. A Hill-Langmuir egyenlet

A receptorelméletet sokan a farmakológia legjellemzőbb és egyben legjelentősebb elméleti eredményének tartják (Kenakin, 2004; Colquhoun, 2006; Rang, 2006; Maehle 2009). A szervezet „receptív szubsztanciáinak” létezését - tudományos formában - először John Newport Langley vetette fel 1878-ban. Paul Ehrlich 1897-ben, Langley-től függetlenül kidolgozott modellje szerint bizonyos - exogén illetve endogén - anyagok az élő szövetekben specifikus endogén kötőhelyekkel való kapcsolódás révén válnak képessé hatásuk kifejtésére. Ezt fejezi ki híres mondása is: „Corpora non agunt nisi fixata”, vagyis „A testecskék nem fejtenek ki hatást, hacsak nem kötődnek”. Ezt az elképzelését először csak tápanyagokra és toxinokra vonatkoztatta, később viszont a többi bioaktív anyagra is kiterjesztette. Magát a „receptor” kifejezést 1900-ban használta először Ehrlich (Maehle, 2009).

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, vagyis a kötődés révén olyan konformációváltozást indukál a receptoron, ami végeredményben megváltoztatja a receptort hordozó sejt működését. A ligand és a receptor kapcsolatát kvantitatíve elsőként Archibald Vivian Hill jellemezte 1910-ben. Mivel néhány évvel később tőle függetlenül ugyanezt az összefüggést Irving Langmuir is leírta a gázok fémfelületen való adszorpciójára, a kérdéses egyenletet ma Hill illetve Langmuir egyenletnek is hívják (Kenakin, 2004; Colquhoun, 2006; Rang, 2006). A legfrissebb ajánlás alapján egy agonista koncentrációja és a kiváltott hatás közötti kapcsolatra a Hill egyenlet elnevezést használjuk, míg egy ligand koncentrációja és a ligandot kötött receptor koncentrációja közötti összefüggést Hill-Langmuir egyenletnek nevezzük (Neubig és mtsai, 2003). A Hill egyenlet tekinthető a legelső kvantitatív receptor modellnek, míg a Hill-Langmuir egyenlet az első összefüggés, amelyik leírja a kapcsolatot két egymáshoz kötődni képes anyag és kettejük komplexének koncentrációi között.

A Hill-Langmuir egyenlet (2.4.) levezethető a tömeghatás törvényének egyensúlyi állapotra vonatkozó formájából (2.3. egyenlet):



$$[L_nR] = [R_0] \cdot \frac{[L]^n}{[L]^n + K_d} = [R_0] \cdot \frac{[L]^n}{[L]^n + (K)^n} \quad 2.4.$$

ahol: L - a ligand; R - a receptor;  $L_nR$  - a receptor-ligand komplex;  $[L_nR]$  - a receptor-ligand komplex koncentrációja (receptor okkupancia);  $[R_0]$  - az össz-receptor (szabad + kötött) koncentráció;  $[L]$  - elvben a szabad ligand koncentrációja, a gyakorlatban az össz-ligand koncentrációval helyettesítik;  $k_1$  illetve  $k_2$  - az asszociáció illetve a disszociáció sebességi állandója a ligand-receptor komplexre nézve;  $K_d = k_2/k_1$  - a ligand-receptor komplex egyensúlyi disszociációs állandója; K - a féltelítési ligand koncentráció (ha  $n = 1$ , egyenlő a  $K_d$  értékkel); n - a 2.3. egyenletben a ligand-kötőhelyek száma egy receptoron, a 2.4. egyenletben azonban ennél nehezebben interpretálható (Hill koefficiens vagy Hill slope faktor, ld. később). A K a ligand receptorhoz való affinitásának mértéke: minél kisebb, annál nagyobb az affinitás. A  $[L]^n/([L]^n + [K]^n)$  hányados (a 2.4. egyenlet jobb oldalán) az ún. frakcionális receptor okkupancia.

A 2.4. egyenlethez tartozik néhány feltétel, melyek egy része az egyenlet levezetésekor tett elhanyagolásokra vezethető vissza. A legfontosabb feltétel, hogy a folyamat elérje az egyensúlyi állapotot, máskülönben az asszociáció és a disszociáció sebessége befolyásolja az eredményt (ami *in vivo* vizsgálatok során gyakori hibaforrás, ld.: Kenakin, 2009). További feltétel, hogy a szabad ligand koncentráció ne legyen lényegesen kisebb az össz-ligand koncentrációnál (ez biológiai rendszerekben általában teljesül, mivel az össz-ligand koncentráció lényegesen meghaladja az össz-receptor koncentrációt). Lényeges az a feltétel is (a 2.3. egyenletben leírt reakció megköveteli), hogy az azonos receptoron levő kötőhelyekre egyszerre kötődjenek be a ligandok, vagyis csak a szabad L, szabad

R és a teljesen kötött  $L_nR$  formák fordulhatnak elő. Ha a részlegesen ligand-kötött receptor-formák felhalmozódnak, a 2.4. egyenlettel végzett görbeillesztés rossz becslést ad az egyenletben szereplő anyagok egyensúlyi koncentrációira illetve az interakciót jellemző konstansokra (Weiss, 1997). Ezzel összhangban, noha a Hill koefficiens eredetileg a kötődési reakció egyenletéből származik (2.3. egyenlet), a Hill-Langmuir egyenlet csak akkor ad pontos becslést az egy receptoron előforduló (egynél több) kötőhelyek számára, ha erős pozitív kooperáció áll fenn a kötőhelyek között. Ennek oka, hogy az első ligand bekötődése után meredeken növekvő affinitás nagymértékben növeli az újabb ligandok kötődésének esélyét és ezáltal minimalizálja a részlegesen ligand-kötött receptorok koncentrációját. Amennyiben egy receptoron több kötőhely van, amelyek között nincs erős pozitív kooperáció, a Hill koefficiens alábecsüli a kötőhelyek számát és ezzel párhuzamosan túlbecsüli a  $K_d$ -t (vagy  $K_t$ ) (Weiss, 1997).

#### 2.5.2. Az okkupációs modell

Langley és Ehrlich eredeti felvetését követően Alfred Joseph Clark dolgozta ki az első átfogó receptorelméletet, az ún. okkupációs modellt, melynek alapját Hill egyenlete képezte (Kenakin, 2004; Colquhoun, 2006; Rang, 2006). Ennek megfelelően az okkupációs modell korai formájában a Hill-Langmuir egyenletben található  $[L_nR]$  és  $[R_0]$  helyett az agonista koncentráció hatása és az elérhető legnagyobb hatás szerepelt.

Kiderült azonban, hogy a ligand-receptor kölcsönhatás tulajdonságai nem vihetők át változtatás nélkül az agonista-hatás kapcsolatra. Az elméleti várakozások és a kísérletes tapasztalatok közötti ellentmondások kiküszöbölésére az okkupációs modellt Robert Stephenson radikálisan módosította. Az addig egységként kezelt receptorműködést két részre bontotta: jelfelismerésre és jelátvitelre. A Hill-Langmuir egyenletet (egységnyi értéken rögzített Hill koefficiens mellett) a jelfelismerő funkció kvantifikálására szorította vissza, a jelátvitel leírására pedig egy függvényt vezetett be, amely az agonista-receptor komplex koncentrációját (a jelfelismerés eredményét) a hatáshoz kapcsolta. A

későbbiekben még többször módosított okkupációs modell végső formája és annak reakcióegyenlete (Ruffolo, 1982):



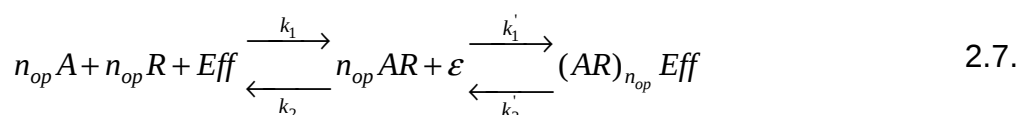
$$E = E_m \cdot f\{\varepsilon \cdot [AR]\} = E_m \cdot f\left\{\varepsilon \cdot [R_0] \cdot \frac{[A]}{[A] + K}\right\} \quad 2.6.$$

ahol (a még nem értelmezett jelölések): A - az agonista; E - a hatás;  $E_m$  - a legnagyobb elérhető hatás az adott rendszerben; [A] - az agonista koncentrációja (a 2.4. egyenletnél látott módon eredetileg a szabad agonista koncentráció, de a gyakorlatban az össz-agonista koncentráció); [AR] - az agonista-receptor komplex koncentrációja;  $\varepsilon$  - az agonista intrinzik hatékonysága (intrinsic efficacy);  $f$  - az a függvény, amely az intrinzik hatékonysággal korrigált receptor okkupanciát a hatáshoz kapcsolja.

A receptor jelfelismerő és jelátvivő működésének megkülönböztetése időtálló hipotézisnek bizonyult. A 2.6. egyenletben a jelfelismerést az affinitás jellemzi, melynek mértéke a K, a jelátvitelt (jelerősítést) pedig az  $E_m$ , az  $\varepsilon$  és az  $[R_0]$  határozzák meg. A Hill koefficiens  $n = 1$  értéke általában nem okoz problémát, mivel a receptorok többségénél összhangban van a ligandkötés sztöchiometriájával. Az  $f$  függvény bevezetése azonban elvette az okkupációs modell egzakt (tisztán kvantitatív) jellegét. Emiatt gyakorlati haszna leginkább az egyes agonisták egymáshoz képesti jellemzésében volt, amikor is az azonos rendszerben vizsgált különböző agonistákra kapott megfelelő adatokat egymással elosztották, így az  $f$  függvényt kiejtve megkapták az agonisták intrinzik hatékonyságainak arányát (Ruffolo, 1982; Black és Leff, 1983).

### 2.5.3. Az agonizmus operatív modellje

Az agonizmus operatív modellje az első olyan egzakt receptorműködési modell, amelyet a szemikvantitatív okkupációs modell (2.6. egyenlet) hiányosságainak kiküszöbölésére dolgoztak ki. Az operatív modell egyben az utolsó olyan egzakt modell, amely - a Hill egyenlethez hasonlóan - általános, vagyis a receptorműködés mechanizmusára vonatkozóan nem tartalmaz előfeltevéseket (illetve csak nagyon általánosakat). Alapját az alábbi reakcióegyenlet képezi (Black és Leff, 1983):



ahol (a még nem definiált jelölések): Eff - a vizsgált hatás kialakulásához szükséges posztreceptorális elemeket szimbolizáló effektor, amelynek elhanyagolhatóan kicsi az affinitása a szabad receptorhoz, de nagy az agonista-receptor komplexhez;  $(AR)_{n_{op}}Eff$  - az agonista-receptor-effektor komplex;  $k_1'$  illetve  $k_2'$  - az asszociáció illetve a disszociáció sebességi állandója az agonista-receptor-effektor komplex esetében;  $n_{op}$  - az operatív meredekségi tényező, amely az egy (hatékony) agonista-receptor-effektor komplex kialakításához szükséges agonista-receptor komplexek számaként interpretálható (operatív slope faktor).

A 2.7. egyenlet első részében szereplő anyagok egyensúlyi koncentrációit a Hill-Langmuir egyenlet írja le, a második részében szereplőket pedig egy a Hill egyenlettel ekvivalens összefüggés, amely a jelátvitelt kvantifikálja (Black és Leff, 1983):

$$[AR] = [R_0] \cdot \frac{[A]}{[A] + K} ; \quad E(\sim [(AR)_{n_{op}} Eff]) = E_m \cdot \frac{[AR]^{n_{op}}}{[AR]^{n_{op}} + K_E^{n_{op}}} \quad 2.8. \text{ és } 2.9.$$

Behelyettesítve a 2.8. egyenletet a 2.9. egyenletbe, majd rendezve azt a következő összefüggést kapjuk (Black és Leff, 1983):

$$E = E_m \cdot \frac{([A] \cdot [R_0])^{n_{op}}}{(K_E \cdot ([A] + K))^{n_{op}} + ([A] \cdot [R_0])^{n_{op}}} = E_m \cdot \frac{([A] \cdot \tau)^{n_{op}}}{([A] + K)^{n_{op}} + ([A] \cdot \tau)^{n_{op}}} \quad 2.10.$$

ahol (a még nem definiált jelölések):  $[(AR)_{n_{op}} \text{Eff}]$  - az agonista-receptor-effektor komplex koncentrációja (amelyről feltételezzük, hogy egyenesen arányos a hatással);  $K_E$  - a félmaximális  $E_m$ -et létrehozó agonista-receptor komplex koncentráció;  $\tau$  - az ún. operatív hatékonyság ( $\tau = [R_0]/K_E$ ), amely az agonista hatáslétrehozó képességének (efficacy) mértéke: mennél nagyobb, annál nagyobb hatást képes létrehozni az agonista, ha egyszer bekötődött. A 2.8. és a 2.9. egyenletekben szereplő  $n_{op}$  inkább a jelátvitel egészét jellemzi, mint tisztán a szignáltranszdukció molekularitását (hasonlóan a Hill-Langmuir egyenlet Hill koefficienséhez a kötődési reakció molekularitását illetően).

Mind az okkupációs, mind az operatív modellel szemben elméleti kifogás fogalmazódott meg (Colquhoun, 1987, 1998, 2006; Bindslev, 2008). Ennek lényege, hogy reakcióegyenleteik (2.5. és 2.7. egyenlet), melyek a hatásig vagy egy azzal egyenesen arányos mennyiségig mennek el, nem tartalmazzák a következő izomerizációs (konformáció-váltó) lépést (del Castillo és Katz, 1957):



ahol (a még nem definiált jelölések): AR illetve  $AR^*$  - az inaktív illetve aktív (a hatás létrehozását lehetővé tevő konformációváltás előtti illetve utáni) agonista-receptor komplex;  $k_1''$  illetve  $k_2''$  - az aktiváció illetve az inaktiváció sebességi állandója.

A 2.11. egyenletben vázolt lépésnek a 2.5. és a 2.7. egyenletekből való kimaradása problematikusá teszi a 2.6. és a 2.10. egyenletekben szereplő  $K$

értelmezését. Emiatt a 2.10. egyenlet illesztése révén kapott K értékek Colquhoun szerint nem becslik pontosan az agonista-receptor komplex egyensúlyi disszociációs konstansát (az ún. mikroszkopikus affinitást), mivel ezeket a K értékeket nem csak a mikroszkopikus affinitás határozza meg, hanem az agonista hatáslétrehozó képessége (efficacy) is, melynek része az agonistát kötött receptor aktiválásának képessége is. Megkülönböztetésül ezeket a K értékeket makroszkopikus affinitásnak nevezték el (Colquhoun, 1998, 2006).

A del Castillo-Katz lépés (2.11. egyenlet) figyelembevételével továbbfejlesztett receptorfunkció modellek közülük a legegyszerűbb a következő (Colquhoun, 1998; Bindslev, 2008):

$$E = E_m \cdot \frac{[A] \cdot L}{[A] \cdot (1 + L) + K} \quad 2.12.$$

ahol (a még nem vagy másképp értelmezett jelölések): K - az inaktív agonista-receptor komplex egyensúlyi disszociációs állandója, amely a mikroszkopikus affinitás mértékének tekinthető; L - az agonista-receptor komplex egyensúlyi aktivációs állandója (izomerizációs konstans:  $L = k_1''/k_2''$ ).

Figyelemreméltó, hogy numerikusan az L egyenlő a  $\tau$ -val, ha az  $n_{op} = 1$  (ld.: 2.10. egyenlet). Ez egyben azt is jelenti, hogy a 2.12. egyenlet és az operatív modell (2.10. egyenlet) egységnyi  $n_{op}$  esetén alakilag megegyeznek, csak a két fő jellemző, az affinitás (K) és a hatáslétrehozó képesség ( $\tau$  illetve L) értelmezésében térnek el. A hatáslétrehozó képességet (jelátvitelt) a  $\tau$  illetve L mellett az  $E_m$  is meghatározza, de ez utóbbi csak a rendszer részéről (tehát az agonista tulajdonságaitól függetlenül).

A 2.12. egyenlet által fémjelzett modell azonban már nem tekinthető általánosnak, mivel a mögöttes reakcióegyenlet csak az aktív agonista-receptor komplex kialakulásáig követi a folyamatot (mint ezt az L értelmezése is mutatja), a hatást egyszerűen egyenesen arányosnak veszi az aktív agonista-receptor komplex koncentrációjával. A 2.12. egyenlet ennek megfelelően pl. ioncsatorna-receptorok jellemzésére alkalmas, amennyiben a hatás pl. az ionkoncentráció

valamely kompartmentben való változása (tehát egy olyan mennyiség, amely egyszerű módon függ az ioncsatorna nyitásától, vagyis a receptor aktivációjától) (Colquhoun, 1998; Bindslev, 2008).

#### 2.5.4. A Hill egyenlet

A receptorműködés általános (sőt legáltalánosabb és legegyszerűbb) modelljének a történelmi Hill egyenlet által rögzített összefüggés tekinthető. A 2003-as ajánlás szerinti Hill egyenlet (Neubig és mtsai, 2003) egy közismert formában:

$$E = E_{\max} \cdot \frac{[A]^n}{[A]^n + (EC_{50})^n} \quad 2.13.$$

ahol (a még nem definiált jelölések):  $E_{\max}$  - az adott agonistával az adott rendszerben elérhető legnagyobb hatás (szemben az  $E_m$ -mel, amely független az agonistától);  $EC_{50}$  - az  $E_{\max}$  felét kiváltó agonista koncentráció. Az  $EC_{50}$  a  $K$  helyére került, ez különbözteti meg a 2.13. egyenletet az okkupációs modell korai formájától illetve a későbbi forma receptoriális jelfelismerést leíró részétől (ld.: 2.6. egyenlet).

A 2.13. egyenletet nem érinti David Colquhoun kritikája a del Castillo-Katz lépés figyelmen kívül hagyásával kapcsolatban (Colquhoun, 1987, 1998, 2006), mivel a Hill modell (és néhány hasonlóan egyszerű modell, mint a Richards egyenlet, Hodgkin egyenlet, Douglas egyenlet, Gompertz egyenlet; ld.: Keller és mtsai, 2002) nem bontja fel a receptorműködést jelfelismerő és jelátvivő funkcióra. Ebből következően a Hill egyenlet és a többi egyszerű modell nagymértékben (bár nem teljesen) független a receptorműködés mechanizmusától. Ennek az az ára, hogy paramétereik, amelyek az agonista koncentrációt a hatáshoz illesztik, tisztán empirikusak, vagyis nincs fiziko-kémiai jelentésük (Giraldo és mtsai, 2002).

### 2.5.5. A céljainknak megfelelő modell kiválasztása

A E/c görbék számítógépes szimulációjához a receptorműködési modellek közül az operatív modellt (2.10. egyenlet) választottuk ki. A döntést megalapozó szempontok a következők voltak:

1. Az operatív modell teljesen kvantitatív (egzakt) receptorműködési modell (Black és Leff, 1983).

2. Az operatív modell általános, nem tartalmaz a jelátvitel mechanizmusára vonatkozó megszorítást (Black és Leff, 1983).

3. Az operatív modell a legegyszerűbb olyan kvantitatív modell, amely az agonistát és a rendszert külön jellemzi (már amennyire ez lehetséges). A modell megkülönbözteti az agonisták két, általánosan külön kezelt tulajdonságát, a receptorhoz való affinitást és a kötődés utáni hatáskiváltó képességet (efficacy) (Black és Leff, 1983; Giraldo és mtsai, 2002).

4. Az operatív modellnek van olyan kiterjesztett formája, amely képes két, ugyanarra a receptorra specifikus agonista szimultán hatását leírni (Leff és mtsai, 1993). Ezzel lehetőség nyílik a torzító és a teszt agonista hatását ugyanabban a rendszerben szimulálni.

5. Az operatív modell egységnyi meredekségi tényező ( $n_{op}$ ) esetén szimmetrikus függvényt határoz meg,  $n_{op} \neq 1$  esetén viszont aszimmetrikus függvényt (Giraldo és mtsai, 2002). Ez a modell tehát alkalmas az aszimmetria hatásának tanulmányozásához.

6. Az operatív modell E/c görbe adatokra való illesztése esetén számolni kell az affinitást és az efficacy-t jellemző regressziós paraméterek ( $K$  és  $\tau$ ) közötti korrelációval, vagyis azzal, hogy a görbeillesztő program könnyen túlbecsülheti az affinitást az efficacy ezzel párhuzamos alulbecslésével, illetve fordítva (Van der Graaf és Stam, 1999). Az operatív modellel meghatározott  $K$  és  $\tau$  megbízhatóságát ezen túl interpretációs probléma is zavarja. Mivel a del Castillo-Katz lépés (2.11. egyenlet) kimaradt az operatív modell reakcióegyenletéből, felmerül a kérdés, hogy a  $K$  az agonista-receptor komplex egyensúlyi disszociációs konstansa-e (mikroszkópos affinitás), vagy magában foglalja a receptor konformáció-váltásának

(izomerizációjának) jellemzését is (makroszkópos affinitás) (Colquhoun, 1998). Ez a kérdés a teoretikus választól függetlenül nehezíti az operatív modell illesztésével kapott eredmények értelmezését. Ezzel szemben mi a 2.10. egyenletet nem görbeillesztéshez, hanem algebrai számításokhoz használtuk, tehát mi dönthettük el, hogyan értelmezzük a  $K$ -t és a  $\tau$ -t. A disszertációt megalapozó számítógépes szimuláció során a  $K$ -t a mikroszkópos affinitás mértékének tekintettük, a  $\tau$ -t pedig mindazon folyamatok jellemzőjének, amelyek a még inaktív agonista-receptor komplex koncentrációját és a hatást összekapcsolják. Ezzel kikerültük azokat az elméleti és gyakorlati problémákat, amelyek az operatív modell alkalmazását érintik.

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. A tiroxin-kezelés és az ADA gátlás hatásának ex vivo vizsgálata

##### 3.1.1. Oldatok

Kísérleteinkhez a következő anyagokat használtuk: módosított Krebs-Henseleit pufferhez (Krebs oldat) szükséges sók; adenzin; inozin;  $N^6$ -cyclopentyladenosine (CPA); *erythro*-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine (EHNA); 2'-deoxycoformycin (pentostatin, DCF); az L-tiroxin Na-sójának pentahidrátja ( $T_4$ ). A Krebs oldathoz való sókat a DEOEC Egyetemi Gyógyszertárból szereztük be, a többi vegyszert a Sigma-tól (St. Louis, MO, USA) rendeltük, kivéve a DCF-et, amely a Wyeth Pharmaceuticals (Collegeville, PA, USA) ajándéka volt.

A Krebs oldat összetétele (mM): NaCl: 118; KCl: 4.7;  $CaCl_2$ : 2.5;  $NaH_2PO_4$ : 1;  $MgCl_2$ : 1.2;  $NaHCO_3$ : 24.9; D-glükóz: 11.5; acidum ascorbicum: 0.1 (bidesztillált vízben oldva). Az adenzint és az inozint 36 °C-os Krebs oldatban oldottuk fel. A 10 mM CPA törzsoldatot etanol és víz 1:4 (V/V) arányú oldatával készítettük, ezt Krebs oldattal hígítottuk tovább. Az EHNA-t etanol és víz 1:1 (V/V) arányú elegyében oldottuk (az etanol koncentrációja a szervkádakban sosem haladta meg a 0.53 V/V %-ot). A DCF oldatot a gyártótól kapott Nipent<sup>TM</sup> ampulla tartalmának előírás szerinti oldásával kaptuk. A  $T_4$  fiziológiás sóoldatban került felhasználásra, amely a  $T_4$  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.

##### 3.1.2. Állatok

Kísérleteinkhez 400-700 g testtömegű hím tengerimalacokat használtunk fel. Az állatok tartása, előkezelése és feldolgozása összhangban volt a Debreceni

Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottságának Etikai Kódexében megfogalmazottakkal és az ide vonatkozó Európai Unió előírásokkal.

### 3.1.3. *In vivo* kezelés

Az állatokat random módon két részre osztottuk: T<sub>4</sub> kezelt és oldószer-kezelt (S kezelt) csoportra.

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

### 3.1.4. *A bal pitvarok preparálása és előinkubációja*

A tengerimalacokat guillotine segítségével lefejeztük. A mellkas feltárása után a szívet eltávolítottuk és 5 °C-os oxigenált K rebs oldatba helyeztük. A bal pitvart levágtuk, majd az apex auriculae-ra és a vágott szél ettől legtávolabbi pontjára egy-egy 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. A Krebs oldatot 95% O<sub>2</sub> és 5% CO<sub>2</sub> elegyével oxigenáltuk, ami az oldat pH értékét 7.4-re állította be. A pitvar másik fonalat 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 (a mosások után) rendszeresen ellenőriztünk és korrigáltunk.

A pitvarokat a felfüggesztés befejeztétől programozható elektrostimulátorral (ST-02, Experimetria, Budapest) ingereltük a tuskón található platina elektródokon keresztül. A pontszerű 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 előinkubáltuk Krebs oldatban, ami alatt a kontraktilitási paraméterek stabilizálódtak. A szervkádak oldatát 15-20 percenként cseréltük (mosás). Az S kezelt és T<sub>4</sub> kezelt csoportba tartozó pitvarokat random módon további 4-4 alcsoportba soroltuk az előinkubáció alatt (ld. később). A pitvarok izometriás összehúzódásait regisztráltunk, kontrakciós erőnek az összehúzódások amplitúdóját tekintettük.

#### 3.1.5. Adenozin E/c görbék

Az előinkubáció után minden kísérleti alcsoportban elsőként kumulatív adenozin E/c görbét vettünk fel, ami a következő célokat szolgálta:

1. Biztosította a preparátumok „edzését” (csökkentette a másodjára felvett E/c görbe adatainak szórását).
2. Verifikálta a T<sub>4</sub> hatását a pitvarokon (mivel a T<sub>4</sub> kezelés markánsan megváltoztatja az adenozinra adott választ, ld.: 4.1.3. alfejezet).
3. Az általa nyert adatok alapján zártuk ki az anomális pitvarokat a vizsgálatból (ld.: 3.1.9. alfejezet).
4. Igazolta az azonos *in vivo* kezelésű csoportok homogenitását (legalábbis az adenozinra adott válasz szempontjából).

Az adenozin mint A<sub>1</sub> receptor agonista különösen alkalmas ezekre a célokra, mivel másodperces felezési ideje miatt gyorsan és zavaró metabolitok hátrahagyása nélkül eliminálódik a preparátumból, így a következő E/c görbét nem zavarja.

#### 3.1.6. *In vitro* kezelés

Az adenozin kimosása (15-20 perc) után két protokoll egyikét hajtottuk végre a kialakított alcsoportokon. Az egyik protokoll alapján a pitvarokat 60 perces *in vitro* kezelésnek vetettük alá a következő alcsoportok esetében (az alcsoport nevében szereplő vegyülettel):

1. S kezelt kontroll alcsoport (S Co; n = 7)
2. S és EHNA kezelt alcsoport (S EHNA; n = 7)
3. S és DCF kezelt alcsoport (S DCF; n = 8)
4. T<sub>4</sub> kezelt kontroll alcsoport (T Co; n = 7)
5. T<sub>4</sub> és EHNA kezelt alcsoport (T EHNA; n = 8)
6. T<sub>4</sub> és DCF kezelt alcsoport (T DCF; n = 8).

A másik protokollhoz tartozó két alcsoport nem kapott *in vitro* kezelést (a második E/c görbe közvetlenül a 15-20 perces mosás után került felvételre):

1. S kezelt alcsoport (S Ø; n = 4)
2. T<sub>4</sub> kezelt alcsoport (T Ø; n = 4).

### 3.1.7. CPA E/c görbék

Az *in vitro* kezelt hat alcsoport pitvarain kumulatív E/c görbét vettünk fel CPA-val, amely igen szelektív A<sub>1</sub> receptor agonista. Mivel a CPA nem szubsztrátja a myocardiumban található adenosin-bontó illetve újrahasznosító enzimeknek, vérmentes pitvarszövetben a E/c görbe felvétele alatt (20-40 perc) alig csökken a koncentrációja (Gesztelyi és mtsai, 2004). A CPA lassú eliminációja miatt nehezen távolítható el a pitvarból, ezért lemondtunk az önkontrollos kísérleti elrendezésről (amelyben ugyanazon a preparátumon vettünk volna fel „kontroll” és „*in vitro* kezelt” CPA E/c görbét). Emiatt hoztunk létre külön kontroll alcsoportokat, amelyekhez a többi alcsoportot hasonlítottuk (az azonos csoporton belül).

### 3.1.8. Inozin E/c görbék

Az *in vitro* kezelés nélküli két alcsoport pitvarain inozinnal vettünk fel kumulatív E/c görbét. Az inozin képes befolyásolni a szív adenosinerg rendszerét, ezért vizsgáltuk az általa kifejtett direkt inotróp hatást.

### 3.1.9. 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 adenzin E/c görbe előtt.

2. A pitvarok mechanikai aktivitása szabályos (arrhythmától mentes) kellett legyen.

3. Miután kiválasztottuk az adenzin E/c görbék EC<sub>50</sub>-éhez legközelebbi adenzin koncentrációt (S kezelt pitvarok esetében ez 10 µM volt, T<sub>4</sub> kezeltéknél pedig 100 µM), az arra adott válasznak belül kellett lennie a számtani közép ± 2 SD (standard deviáció) intervallumon. A számtani közepet és a SD-t az első két feltételt teljesítő pitvarokra határoztuk meg, külön az S és a T<sub>4</sub> kezelt csoportban.

Minden pitvar adatait felhasználtuk, amelyek teljesítette a 3 beválasztási kritériumot.

### 3.1.10. A kontrakciós erő és E/c görbe adatok feldolgozása

A preparátumok intakt kontrakciós erejének az első E/c görbe felvétele során mért kiindulási kontrakciós erőt tekintettük. Az *in vitro* kezelés hatására (még a második E/c görbe felvétele előtt) kialakult kontrakciós erőt az intakt kontrakciós erő százalékában fejeztük ki a kezeléshez használt szer inotróp hatásának jellemzésére.

A E/c görbék felvétele során egy adott agonista koncentráció hatásának a kontrakciós erő legnagyobb csökkenését vettük a kiindulási kontrakciós erő százalékában (az adott koncentráció jelenlétében). A E/c görbék pontjaira a Hill egyenletet illesztettük (3.2. egyenlet). Az egyes preparátumok válaszkészségét az adott agonistával szemben E/c görbéjük E<sub>max</sub>, logEC<sub>50</sub> és n paramétereivel jellemeztük.

### 3.1.11. Statisztikai elemzés

Az egyes csoportok illetve alcsoportok adatainak eloszlását normalitászvizsgálattal ellenőriztük. Homogén varianciákat mutató két csoport számtani közepeinek összehasonlításához kétoldalú kétmintás párosítatlant Student-féle t tesztet használtunk, ha viszont a két csoport varianciái különböztek, Welch-korrigált t tesztet. Kettőnél több csoport összehasonlítását kétutas varianciaanalízissel (ANOVA) végeztük, melyet Bonferroni poszt-teszttel egészítettünk ki. A véletlen oki szerepét  $p < 0.05$  esetén vetettük el.

A E/c görbék esetében egyrészt az azonos koncentrációkhoz tartozó, alcsoportonként átlagolt hatásokat hasonlítottuk össze, másrészt a Hill egyenlet illesztésével nyert  $E_{\max}$ ,  $\log EC_{50}$  és  $n$  értékeket (az  $EC_{50}$  logaritmálására azért volt szükség, hogy az adatok normál eloszlásúvá váljanak).

## 3.2. Az agonista- és rendszer-tulajdonságok hatásának *in silico* vizsgálata

A szimuláció során először agonistákat és farmakológiai rendszereket definiáltunk, majd ebből kiindulva megszerkesztettük az agonisták E/c görbéit és meghatároztuk ezek alaki sajátosságait. Ezt követően olyan E/c görbét szerkesztettünk, amelyek két-két agonista szimultán hatását jelenítették meg ugyanabban a rendszerben. Az agonista párok egyik tagját állandó koncentrációval vettük figyelembe mint torzító agonistát, míg a másikként mint teszt agonistából felszálló koncentráció sort képeztünk. Ezután a E/c görbét úgy transzformáltuk, mintha a torzító koncentrációkat figyelmen kívül hagytuk volna felvételük során. Ezt követően az RRM segítségével meghatároztuk a torzító koncentrációkat a transzformált (torzított) E/c görbék és a teszt agonisták egyedüli hatását reprezentáló E/c görbék adatainak felhasználásával. Ha a torzító és a teszt agonista azonos volt, a görbeillesztéssel kapott regressziós paraméterek közvetlenül adták meg a torzító koncentrációt, ha nem, a regressziós

paramétereket még átszámoltuk az alkalmazott torzító agonista koncentrációjává. Végezetül az így kapott becsléseket összehasonlítottuk azokkal a torzító agonista koncentrációkkal, amelyeket a szimuláció során használtunk mint input adatokat. A torzító és a teszt agonista különbözőségének hatásán túl a farmakológiai rendszer egy jellegzetességének hatását is vizsgáltuk az RRM pontosságára oly módon, hogy a E/c görbék szimulációját többféle görbe-mereedségi faktor mellett is elvégeztük. Az *in silico* vizsgálatok harmadik szakaszában az RRM során a görbeillesztéshez két egyenletet is használtunk. Az egyik az RRM hagyományos egyenlete, míg a másikat külön ehhez a vizsgálathoz szerkesztettük meg oly módon, hogy figyelembe tudja venni az illesztett E/c görbék esetleges aszimmetriáját.

### 3.2.1. Torzítatlan, egyagonistás E/c görbék szerkesztése

A paraméterek megválasztásával agonistákat és farmakológiai rendszereket definiáltunk az agonizmus operatív modelljének keretein belül, majd ezek alapján hatás értékeket számoltunk ki az alábbi egyenlet segítségével, ami tartalmilag ekvivalens a 2.10. egyenlettel (eredeti formájában ld. itt: equation (10); Black és Leff, 1983):

$$E = E_m \cdot \frac{[R_0]^{n_{op}} \cdot c^{n_{op}}}{K_E^{n_{op}} \cdot (K + c)^{n_{op}} + [R_0]^{n_{op}} \cdot c^{n_{op}}} \quad 3.1.$$

ahol: E - a hatás;  $E_m$  - a legnagyobb elérhető hatás az adott rendszerben;  $[R_0]$  - a receptor koncentráció; c - az agonista koncentráció; K - az agonista-receptor komplex egyensúlyi disszociációs konstansa (az agonista affinitásának reciprok jellegű mértéke);  $K_E$  - az agonista kötődés utáni hatáskiváltó képességének (efficacy) reciprok jellegű mértéke;  $n_{op}$  - az operatív mereedségi tényező (operational slope factor).

Szimulációs vizsgálataink első és második szakaszában az agonistákhoz három lehetséges K érték ( $10^{-9}$  M;  $10^{-8}$  M;  $10^{-7}$  M) és  $K_E$  ( $10^{-12}$  M;  $10^{-11}$  M;  $10^{-10}$  M)

együkét rendeltük. A  $K$  és  $K_E$  értékek kombinációja kilenc különböző agonistát eredményezett, melyeket A-tól I-ig jelöltünk. Az  $[R_0]$  illetve  $E_m$  rendszerparamétereket az *in silico* vizsgálatok során végig  $10^{-10}$  M illetve 100 értéken tartottuk, míg az  $n_{op}$  három értéket vehetett fel: 0.5, 1 és 1.5, ami három különböző rendszert határozott meg.

A szimulációs vizsgálatok harmadik szakaszában az agonistákhoz ( $10^{-8}$  M értéken rögzített  $K$  mellett) hét lehetséges  $K_E$  érték ( $10^{-9}$  M;  $10^{-9.5}$  M;  $10^{-10}$  M;  $10^{-10.5}$  M;  $10^{-11}$  M;  $10^{-11.5}$  M;  $10^{-12}$  M) egyikét rendeltük, a hét különböző agonistát A-tól G-ig jelöltünk. Az  $n_{op}$  a harmadik szakaszban 0.5, 1 és 2 értékeket vehetett fel, ami szintén három rendszert határozott meg.

A 3.1. egyenlet segítségével számolt hatásokat a megfelelő agonista koncentrációjának függvényében ábrázoltuk. Ezek a függvények az agonisták „torzítatlan” (saját) E/c görbéinek tekinthetők.

### 3.2.2. A Hill és a Richards egyenlet illesztése a torzítatlan, egyagonistás E/c görbékre

Az agonisták torzítatlan E/c görbéit a Hill és a Richards egyenlet illesztésével karakterizáltuk. A Hill egyenletet (3.2. egyenlet; ekvivalens a 2.13. egyenlettel) mindhárom vizsgálati szakasz agonistáinak torzítatlan E/c görbéire illesztettük, míg a Richards egyenletet (3.3. egyenlet) csak a harmadik szakaszbeli agonisták torzítatlan E/c görbéire:

$$E = \frac{E_{\max}}{1 + 10^{n(\log EC_{50} - \log c)}} \quad \text{és} \quad E = \frac{E_{\max}}{\left(1 + 10^{n(\log X_b - \log c)}\right)^S} \quad 3.2. \text{ és } 3.3.$$

ahol (a Módszerek fejezetben még nem definiált paraméterek):  $E_{\max}$  - az adott agonistával az adott rendszerben elérhető legnagyobb hatás;  $EC_{50}$  - a félhatásos koncentráció (a függvény középpontja);  $n$  - a Hill koefficiens (ami szoros kapcsolatban van az operatív meredekségi tényezővel);  $S$  - a szimmetria tényező (ha különbözik 1-től, a függvény aszimmetrikus, vagyis a középpont és az inflexió)

pont nem esik egybe);  $X_b$  - egy az eddigiekre visszavezethető paraméter:

$$X_b = EC_{50} \cdot (2^{1/S} - 1)^{1/n}.$$

Az első és a második vizsgálati szakaszban a Hill egyenletet a legtöbb agonista E/c görbéjére csak az illusztráció kedvéért illesztettük, a kapott regressziós paramétereket ( $E_{max}$ ,  $\log EC_{50}$ ,  $n$ ) csak az A agonista esetében használtuk fel (ld. 3.2.5. alfejezet). A harmadik vizsgálati szakaszban a Hill és a Richards modell illeszkedését minden agonista és minden rendszer esetében összehasonlítottuk (F-teszttel), a későbbiek során pedig a D agonista regressziós paramétereit ( $E_{max}$ ,  $\log EC_{50}$ ,  $\log X_b$ ,  $n$ ,  $S$ ) használtuk fel (ld. 3.2.5. alfejezet).

### 3.2.3. Torzítatlan, kétagonistás E/c görbék szerkesztése

Az egyes torzító és teszt agonista párok szimultán hatását az alábbi egyenlettel számoltuk ki (ld. equation (vii) itt: Leff és mtsai, 1993):

$$E = E_m \cdot \frac{(\tau_{test} \cdot c_{test} \cdot K_{bias} + \tau_{bias} \cdot c_{bias} \cdot K_{test})^{n_{op}}}{(c_{test} \cdot K_{bias} + K_{test} \cdot K_{bias} + c_{bias} \cdot K_{test})^{n_{op}} + (\tau_{test} \cdot c_{test} \cdot K_{bias} + \tau_{bias} \cdot c_{bias} \cdot K_{test})^{n_{op}}} \quad 3.4.$$

ahol (az itt még nem említett paraméterek):  $c_{test}$  - a teszt agonista koncentrációja;  $c_{bias}$  - a torzító agonista koncentrációja;  $K_{test}$  - a teszt agonista K értéke;  $K_{bias}$  - a torzító agonista K értéke;  $\tau_{test}$  - a teszt agonista operatív hatékonysága (operational efficacy), ami a teszt agonista kötődés utáni hatáskiváltó képességének mértéke ( $\tau_{test} = [R_0]/K_{Etest}$ );  $\tau_{bias}$  - a torzító agonista operatív hatékonysága ( $\tau_{bias} = [R_0]/K_{Ebias}$ ).

Az első és a második vizsgálati szakasz során végig az A agonista volt a teszt agonista, melyet  $10^{-14}$  M –  $10^{-5}$  M koncentráció-tartományban alkalmaztunk. Az első vizsgálati szakaszban az A agonista volt a torzító agonista is ( $10^{-12}$  M –  $3 \cdot 10^{-7}$  M koncentráció-tartományban), míg a második szakaszban az agonisták (A-I) torzítatlan egyagonistás E/c görbéinek  $EC_{25}$ ,  $EC_{50}$  illetve  $EC_{75}$  értékei szolgáltak

$c_{bias}$  gyanánt. A szimulációt mindhárom farmakológiai rendszerre (mindhárom  $n_{op}$  mellett) elvégeztük.

Vizsgálataink harmadik szakaszában a D agonista volt a teszt agonista  $10^{-14}$  M –  $10^{-5}$  M koncentráció-tartományban. A  $c_{bias}$  értékeket az agonisták (A-G) torzítatlan egyagonistás E/c görbéinek  $EC_{15}$ ,  $EC_{25}$ ,  $EC_{50}$ ,  $EC_{75}$  illetve  $EC_{85}$  értékei adták mindhárom rendszerben.

A görbeillesztés hibáinak elkerülése érdekében valamennyi  $EC_F$  értéket (ahol is:  $F = (E/E_{max}) \cdot 100$ ) algebrai úton határoztuk meg. Az  $EC_{50}$ -et az operatív modellből kiindulva az alábbi egyenlet alapján számoltuk (ld. equation (11) itt: Black és Leff, 1983):

$$EC_{50} = K \cdot \frac{1}{\left(2 + \tau^{n_{op}}\right)^{\frac{1}{n_{op}}} - 1} \quad 3.5.$$

A többi  $EC_F$  értéket a megfelelő  $EC_{50}$ -ból és  $n_{op}$ -ból számoltuk ki a következő egyenlet segítségével (Motulsky és Christopoulos, 2003):

$$EC_F = EC_{50} \cdot \left(\frac{F}{100 - F}\right)^{\frac{1}{n_{op}}} \quad 3.6.$$

A 3.6. egyenlet eredetileg a Hill modell keretein belül teremt kapcsolatot az  $EC_F$ , az  $EC_{50}$  és  $n$  (Hill koefficiens) között (Motulsky és Christopoulos, 2003). Vizsgálataink során (a Hill egyenlet illesztéséből származó hiba elkerülésére) a Hill koefficienst az  $n_{op}$  helyettesítette. Ily módon, míg a 3.5. egyenlettel számolt  $EC_{50}$  elméletileg is helyes, a 3.6. egyenlettel kapott  $EC_{15}$ ,  $EC_{25}$ ,  $EC_{75}$  illetve  $EC_{85}$  értékek eltérnek a valódi  $EC_{15}$ ,  $EC_{25}$ ,  $EC_{75}$  illetve  $EC_{85}$  értékektől, amennyiben az  $n$  különbözik az  $n_{op}$ -tól. Ez az eltérés azonban nem befolyásolta lényegesen a szimuláció eredményét, mivel egy agonistán és rendszeren belül a vizsgált  $EC_F$  értékek tetszőlegesen lehetnek, míg különböző agonisták és rendszerek összehasonlításakor a hiba elenyésző.

Ha a 3.4. egyenlettel számolt hatásokat a  $c_{test}$  és a  $c_{bias}$  összegének függvényében ábrázolnánk, a kapott függvények az együtt ható agonisták torzítatlan E/c görbéi lennének (mivel semmit sem hagynánk figyelmen kívül a számítás és az ábrázolás során).

#### 3.2.4. A kétagonistás E/c görbék torzítása

A 3.4. egyenlettel számolt hatások transzformációját (torzítását) az alábbi egyenlettel végeztük (ld.: 2.1. egyenlet; equation (5) itt: Gesztelyi és mtsai, 2004):

$$E' = 100 - \frac{100 \cdot (100 - E)}{100 - E_{bias}} \quad 3.7.$$

ahol (az ebben a fejezetben még nem említett paraméterek):  $E'$  - a torzult hatás;  $E$  - a 3.4. egyenlettel számolt (torzítatlan) hatás;  $E_{bias}$  - a  $c_{bias}$  által kiváltott hatás (a 3.4. egyenlettel számolva oly módon, hogy azonos paraméterek mellett a  $c_{test} = 0$ ).

A 3.7. egyenlettel végzett transzformáció tehát azt szimulálta, hogy egy figyelmen kívül hagyott  $c_{bias}$  van a rendszerben, ami létrehozott egy figyelmen kívül hagyott  $E_{bias}$  hatást. Ennek megfelelően a 3.7. egyenlettel kapott torzult hatásokat csak a  $c_{test}$  függvényében ábrázoltuk, ami torzult E/c görbéket hozott létre (teljesen mellőzve a  $c_{bias}$ -t és az  $E_{bias}$ -t).

#### 3.2.5. Az RRM két egyenletének illesztése a torzult, kétagonistás E/c görbékre

A torzult E/c görbékre az első két vizsgálati szakaszban csak a 3.8. egyenletet illesztettük (ami ekvivalens a 2.2. egyenlettel), míg a harmadik vizsgálati szakaszban mind a 3.8., mind a 3.9. egyenletet:

$$E' = 100 - \frac{100 \cdot \left( 100 - \frac{E_{\max}}{1 + 10^{n \cdot (\log EC_{50} - \log(10^{\log c_x} + 10^{\log c_{test}}))}} \right)}{100 - \frac{E_{\max}}{1 + 10^{n \cdot (\log EC_{50} - \log c_x)}}} \quad 3.8.$$

$$E' = 100 - \frac{100 \cdot \left( 100 - \frac{E_{\max}}{\left( 1 + 10^{n \cdot (\log X_b - \log(10^{\log c_x} + 10^{\log c_{test}}))} \right)^S} \right)}{100 - \frac{E_{\max}}{\left( 1 + 10^{n \cdot (\log X_b - \log c_x)} \right)^S}} \quad 3.9.$$

ahol (az itt még nem definiált paraméterek):  $c_x$  - az a teszt agonista koncentráció, amelyet azonos hatásúnak várunk a  $c_{bias}$  koncentrációval (a  $c_x$  a 3.8. illetve a 3.9. egyenletek által szolgáltatott egyedüli regressziós paraméter);  $E_{\max}$ ,  $\log EC_{50}$  és  $n$  a 3.8. egyenletben - a Hill egyenlet illesztésével kapott regressziós paraméterek (ld. 3.2.2. alfejezet);  $E_{\max}$ ,  $\log X_b$ ,  $n$  és  $S$  a 3.9. egyenletben - a Richards egyenlet illesztése során kapott regressziós paraméterek (ld. 3.2.2. alfejezet). Azért használtunk regressziós (és nem algebrai úton számolt) paramétereket az RRM egyenleteinek feltöltésére, mert biológiai mintán végzett vizsgálat során a teszt agonista és az adott receptor közötti E/c kapcsolatot csak görbeillesztéssel nyert paraméterekkel tudjuk megfelelő pontossággal kvantifikálni.

A 3.8. egyenlet (ld. equation (8) itt: Gesztelyi és mtsai, 2004) a 3.2. és a 3.7. egyenletekből származik, míg a 3.9. egyenlet a 3.3. és a 3.7. egyenletekből. Ezzel összhangban a 3.9. egyenlet tartalmazza azt az  $S$  paramétert, melynek révén képes figyelembe venni a E/c görbék aszimmetriáját (szemben a 3.8. egyenlettel).

Ha a teszt agonista valamely koncentrációja szolgált  $c_{bias}$ -ként, arra számítottunk, hogy a  $c_x$  egyenlő lesz a  $c_{bias}$ -szel, vagyis a 3.8. és a 3.9. egyenletek illesztése közvetlenül becsüli a  $c_{bias}$ -t. Ha viszont a teszt és a torzító agonista különbözik, a  $c_x$  esetében csak azt várhattuk, hogy egyenlő hatású legyen a  $c_{bias}$ -szel. Utóbbi esetben a  $c_x$ -et átszámoltuk becsléssé, vagyis torzító agonista koncentrációvá. Az átszámítást a következő módon végeztük: Elsőként a  $c_x$ -hez tartozó hatást ( $E_x$ ) számoltuk ki a 3.1. egyenlettel, amely az adott teszt agonista és

rendszer jellemzőit tartalmazta. Ezután az  $E_x$ -hez tartozó torzító agonista koncentrációt számoltuk ki a 3.1. egyenlettel, amelybe a megfelelő torzító agonista és rendszer paramétereket helyettesítettük be (a rendszer természetesen ugyanaz maradt). Az így kapott koncentráció az RRM becslése a  $c_{bias}$ -re. Ideális esetben a  $c_x$  valóban ekvieffektív a  $c_{bias}$ -szel (vagyis az  $E_x$  egyenlő az  $E_{bias}$ -szel; ld. 3.7. egyenlet). Az itt leírt átváltás ( $c_x$ -ből becsléssé) általában nem része az RRM-nek, mivel a szükséges adatok rendszerint nem állnak rendelkezésre megfelelő pontossággal. Egy számítógépes szimuláció során azonban ez az átváltás könnyen és pontosan kivitelezhető, ezáltal lehetőség nyílik a becslések és a  $c_{bias}$  értékek összehasonlítására. Az RRM-mel végzett koncentrációbecslés pontosságának kifejezésére kiszámoltuk a becslések százalékos eltérését a nekik megfelelő  $c_{bias}$  értékektől:

$$\text{százalékos eltérés} = \frac{(becslés - c_{bias})}{c_{bias}} \cdot 100\% . \quad 3.10.$$

Mivel a  $c_x$  a 3.8. és a 3.9. egyenletek egyetlen variábilis paramétere, közöttük nem lehet modell összehasonlítást végezni (F-teszttel) a harmadik vizsgálati szakasz eredményeinek értékelése során. A kétféle egyenlettel kivitelezett koncentrációbecslés pontosságát tehát csak a becslések százalékos eltéréseinek (3.10. egyenlet) segítségével hasonlítottuk össze.

### 3.2.6. Számítógépes szimuláció és adatelemzés

A függvények  $y$  értékeit és a nem görbeillesztéssel nyert paramétereket Microsoft Excel 2003 szoftverrel számítottuk ki. Görbeillesztésre GraphPad Prism 4.03 for Windows szoftvert használtunk. A függvények  $x$  értékeit ( $c$ ,  $c_{test}$ ) és a koncentrációt jelentő paramétereket ( $EC_{50}$ ,  $X_b$ ,  $c_x$ ) az illesztésre használt egyenletekben logaritmikus formában fejeztük ki Motulsky és Christopoulos ajánlásának megfelelően (2003).

## 4. Eredmények

### 4.1. Az ADA gátlás hatása az A<sub>1</sub> receptor mediálta negatív inotrópiára eu- és hyperthyreoid tengerimalac bal pitvaron

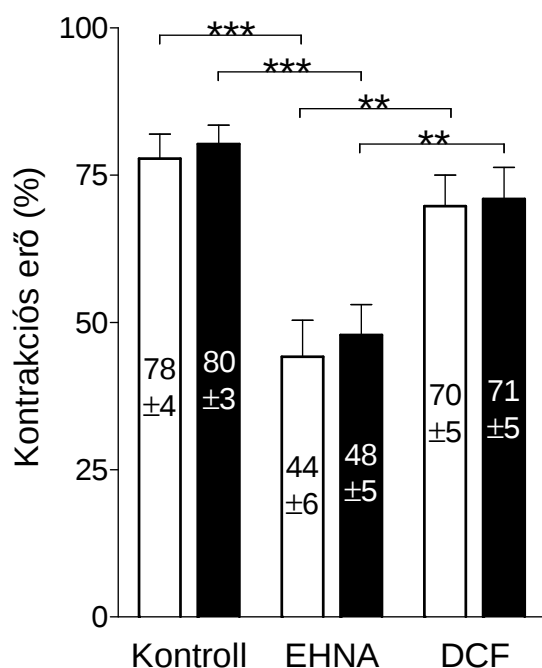
#### 4.1.1. Thyreoid státusz

A nyolc napig tartó *in vivo* kezelés alatt az S kezelt tengerimalacok testtömege illetve rektális hőmérséklete nem változott szignifikánsan (első napos vs. kilencedik napos értékek; számtani közép  $\pm$  SEM):  $522 \pm 13$  g vs.  $526 \pm 14$  g, illetve  $37.5 \pm 0.1$  °C vs.  $37.5 \pm 0.09$  °C. A T<sub>4</sub> kezelés során ezek a paraméterek a következőképpen változtak:  $532 \pm 13$  g vs.  $428 \pm 10$  g ( $p < 0.0001$ ), illetve  $37.4 \pm 0.11$  °C vs.  $38.4 \pm 0.12$  °C ( $p < 0.0001$ ). A bal pitvari fülcse tömegének és a testtömegnek a hányadosa  $0.091 \pm 0.009$  mg/g volt az S kezelt csoportban, míg  $0.135 \pm 0.01$  mg/g volt a T<sub>4</sub> kezelt csoportban ( $p < 0.0001$ ).

#### 4.1.2. Kiindulási kontrakciós erők

A hat alcsoport pitvarainak az *in vitro* kezelés előtt mért kiindulási kontrakciós ereje nem különbözött szignifikánsan egymástól (számtani közép  $\pm$  SEM): S Co:  $8.9 \pm 0.6$  mN; S EHNA:  $9.1 \pm 0.5$  mN; S DCF:  $9.3 \pm 0.8$  mN; T Co:  $7.2 \pm 1.2$  mN; T EHNA:  $8 \pm 0.9$  mN; és T DCF:  $7.2 \pm 1.1$  mN. A kontrakciós erők eltérően csökkentek a három különböző *in vitro* kezelés alatt. A csökkenés az EHNA kezelt alcsoportokban volt a legnagyobb, a kontroll alcsoportokban pedig a legkisebb. Nem találtunk szignifikáns különbséget az azonos *in vitro* kezelt eu- és hyperthyreoid alcsoportok között (1. ábra).

Az *in vitro* kezelés nélküli két alcsoport kiindulási kontrakciós erői nem különböztek szignifikánsan: S Ø:  $11.4 \pm 1.4$  mN; T Ø:  $8.2 \pm 0.4$  mN.



**1. ábra.** Az EHNA és DCF kezelés hatása a kontrakciós erőre. Az *in vitro* kezelés végén mért kontrakciós erőt a kiindulási kontrakciós erő százalékában fejeztük ki és az egyes oszlopokban tüntettük fel (számtani közép ± SEM). A világos oszlopok az *in vivo* oldószer-kezelt állatok pitvarait jellemzik, míg a sötét oszlopok az *in vivo* tiroxin-kezelt állatokét. Az *in vitro* kezelést az oszlopok alatt tüntettük fel. A statisztikai szignifikancia szintjét az oszlopok felett jelöltük: p<0.01 (\*\*) és p<0.001 (\*\*\*). A vegyületek teljes nevét ld.: 3.1.1. alfejezet.

#### 4.1.3. Adenozin és inozin E/c görbék

Az adenozin koncentrációfüggően gyengítette valamennyi pitvar kontrakciós erejét.

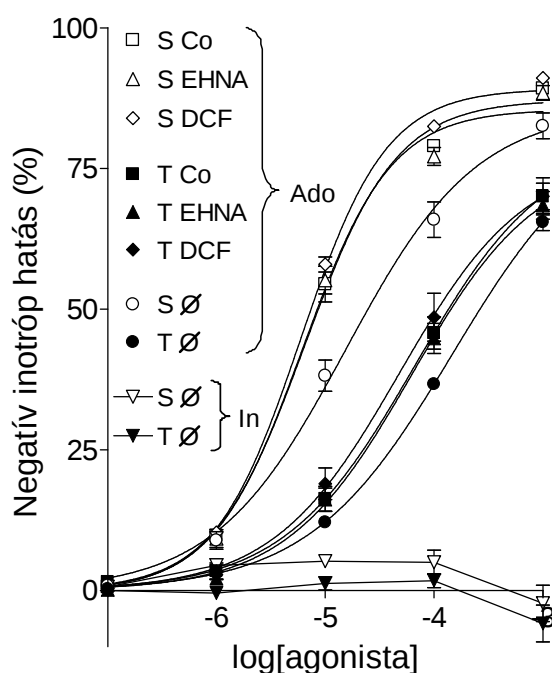
A T<sub>4</sub> kezelés szignifikánsan csökkentette a későbbiekben *in vitro* kezelésen átesett pitvarok E<sub>max</sub> értékét (p<0.001) és Hill koefficiensét (p<0.0001), továbbá szignifikánsan növelte a logEC<sub>50</sub>-et (p<0.0001) az S kezelt pitvarokkal összehasonlítva. Az azonos *in vivo* kezelésű alcsoportok között nem volt szignifikáns különbség (2. ábra).

A T Ø alcsoportban az E<sub>max</sub> és Hill koefficiens nem változott lényegesen, a logEC<sub>50</sub> azonban szignifikánsan nagyobb volt (p<0.001), mint az S Ø alcsoportban (2. ábra).

A jelen összehasonlítás során a későbbiekben *in vitro* kezelt alcsoportok adatait azért nem vontuk össze az *in vitro* kezelésben nem részesült alcsoportok adataival, mert adenozinra adott válaszuk jelentős különbözött (2. ábra). Ennek oka, hogy előbbieket nyáron vizsgáltuk, míg utóbbiakat télen, amikor a tengerimalac pitvarok adenozinnal szembeni érzékenysége kisebb. Mivel az inozinra adott választ nem hasonlítottuk össze az *in vitro* kezelt alcsoportok CPA-

ra adott válaszával, ennek a szezonális ingadozásnak számunkra nem volt jelentősége.

Az inozin gyakorlatilag nem befolyásolta a pitvarok kontrakciós erejét sem az S Ø, sem a T Ø alcsoportban (2. ábra).



**2. ábra.** A nyolc kísérleti alcsoport adenoszinra, ezen túl az S Ø és T Ø alcsoportok inozinra adott inotróp válasza. A későbbiek során *in vitro* kezelést kapó alcsoportok esetében az adenoszin E/c görbe felvétele még az *in vitro* kezelés előtt történt. Az x tengelyen az alkalmazott szer moláris koncentrációjának tízes alapú logaritmusát tüntettük fel, míg az y tengelyen a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenését. A szimbólumok az alcsoportonként átlagolt hatást jelzik (számtani közép  $\pm$  SEM). A vonalak az adenoszin esetében az illesztett Hill egyenletet mutatják, az inozin esetén viszont csak összekötik a szimbólumokat. Ado - adenoszin; Ino - inozin; az alcsoportok nevének magyarázatát ld.: 3.1.6. alfejezet; a vegyületek teljes nevét ld.: 3.1.1. alfejezet.

#### 4.1.4. CPA E/c görbék

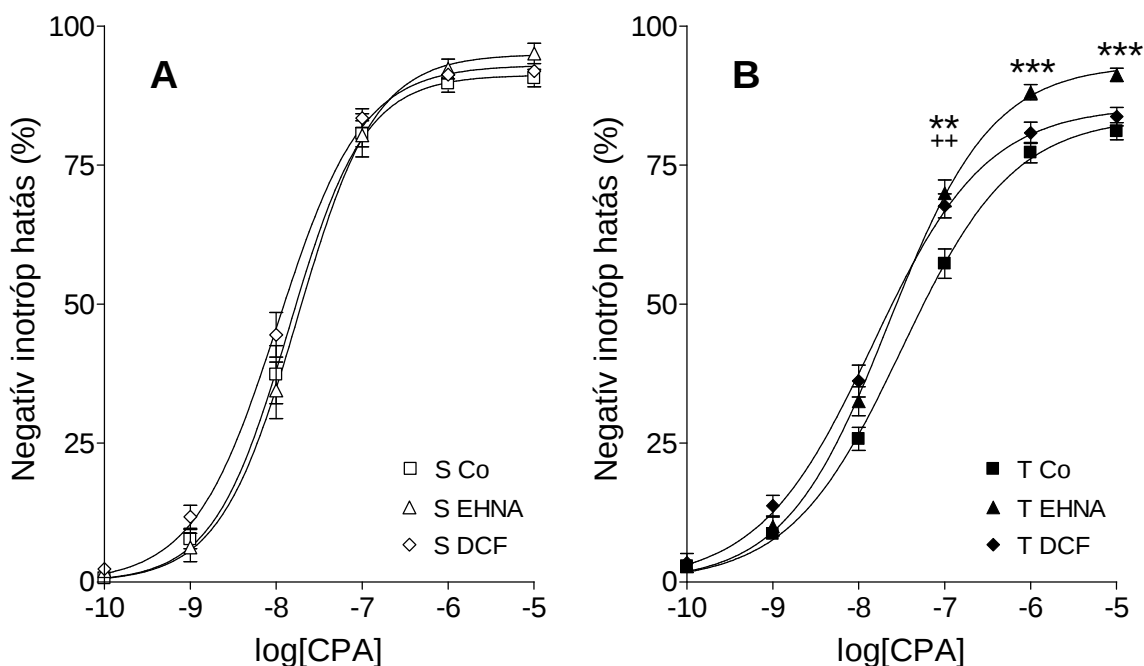
Az adenoszinhoz hasonlóan a CPA is koncentrációfüggő negatív inotróp hatást hozott létre a pitvarokon, amely visszaszorult a T<sub>4</sub> kezelés hatására (1. táblázat; 3. ábra).

Az S kezelt alcsoportok közötti különbségek nem érték el a statisztikai szignifikancia szintjét sem a regressziós paraméterek (1. táblázat), sem az egyes CPA koncentrációkra adott válaszok (3. A ábra) esetében. A T<sub>4</sub> kezelés ezzel szemben felerősítette az EHNA és a DCF (már az S kezelt pitvarokon is tetten érhető) potenciórozó hatását: az EHNA szignifikánsan növelte az E<sub>max</sub>-ot, a DCF pedig szignifikánsan csökkentette a logEC<sub>50</sub>-et. Noha az EHNA is csökkentette a logEC<sub>50</sub>-et és a DCF is növelte az E<sub>max</sub>-ot a T<sub>4</sub> kezelt pitvarokon, ezek a hatások

statisztikailag nem bizonyultak szignifikánsnak (1. táblázat; 3. B ábra). A különböző CPA koncentrációkra adott válaszok esetében a T Co alcsoport szignifikánsan különbözött a T EHNA alcsoporttól 0.1, 1 és 10  $\mu\text{M}$  koncentrációknál, valamint a T DCF alcsoporttól 0.1  $\mu\text{M}$ -nál (3. B ábra). Ezen túlmenően szignifikáns interakció mutatkozott az *in vivo* és az *in vitro* kezelés között 0.1  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ) és 1  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ) koncentrációknál.

|                       | Euthyreoid pitvarok |                      |                      | Hyperthyreoid pitvarok    |                       |                           |
|-----------------------|---------------------|----------------------|----------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------|
|                       | S Co<br>(n=7)       | S EHNA<br>(n=7)      | S DCF<br>(n=8)       | T Co<br>(n=8)             | T EHNA<br>(n=8)       | T DCF<br>(n=8)            |
| $E_{\max}$<br>(%)     | $90.9 \pm 1.6$      | $95.1 \pm 1.8$       | $92.6 \pm 1.1$       | $83.8 \pm 1.2$<br>**      | $93.4 \pm 1.2$<br>### | $85.7 \pm 2$              |
| $\log EC_{50}$        | $-7.86 \pm 0.08$    | $-7.78 \pm 0.1$      | $-8 \pm 0.08$        | $-7.5 \pm 0.07$<br>**     | $-7.65 \pm 0.07$      | $-7.83 \pm 0.07$<br>++    |
| $EC_{50}$<br>(nmol/l) | 13.8<br>(8.7 - 22)  | 16.5<br>(8.9 - 31.9) | 10.1<br>(6.4 - 15.9) | 32<br>(21.9 - 46.7)<br>** | 22.6<br>(15.6 - 32.9) | 14.7<br>(10.3 - 21)<br>++ |
| n                     | $1.06 \pm 0.05$     | $1.04 \pm 0.09$      | $0.95 \pm 0.04$      | $0.69 \pm 0.04$<br>***    | $0.74 \pm 0.05$       | $0.68 \pm 0.05$           |

**1. táblázat.** A CPA E/c görbék paraméterei az *in vitro* kezelt hat alcsoportban. Az  $E_{\max}$ ,  $\log EC_{50}$  és n paramétereket számtani közép  $\pm$  SEM formában adtuk meg, míg az  $EC_{50}$ -et mértani közép  $\pm$  95% konfidencia limit formában. A következő összehasonlításokat tüntettük fel: T Co vs. S Co (\*); S EHNA vs. S Co és T EHNA vs. T Co ( $\neq$ ); S DCF vs. S Co és T DCF vs. T Co (+). Két szimbólum:  $p < 0.01$ ; három szimbólum:  $p < 0.001$ . Az alcsoportok nevének magyarázatát ld.: 3.1.6. alfejezet; a vegyületek teljes nevét ld.: 3.1.1. alfejezet.



**3. ábra.** Az *in vitro* kezelés hatása a CPA-ra adott inotróp válasza *in vivo* oldószer-kezelt (A panel) illetve tiroxin-kezelt (B panel) tengerimalac bal pitvaron. Az x tengelyen a CPA moláris koncentrációjának tízes alapú logaritmusát tüntettük fel, míg az y tengelyen a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenését. A szimbólumok az alcsoportonként átlagolt hatást mutatják (számtani közép  $\pm$  SEM), a vonalak pedig az illesztett Hill egyenletet. Az EHNA és DCF kezelt E/c görbék hatás átlagait a kontroll E/c görbék azonos koncentrációkhoz tartozó hatás átlagaival hasonlítottuk össze (\*: EHNA; +: DCF; két szimbólum:  $p < 0.01$ ; három szimbólum:  $p < 0.001$ ). Az alcsoportok nevének magyarázatát ld.: 3.1.6. alfejezet; a vegyületek teljes nevét ld.: 3.1.1. alfejezet.

## 4.2. Az affinitás, a jelátviteli hatékonyság és az operatív meredekségi tényező befolyása az RRM becsléseinek pontosságára

### 4.2.1. A szimulált agonisták torzítatlan, egyagonistas E/c görbéi

Az *in silico* vizsgálatok első és második szakaszában definiált agonisták saját E/c görbéi három, csoportonként azonos  $E_{max}$ -al rendelkező görbecsoportot alkottak mindhárom rendszerben (4. A-C ábra). Ugyanabba a csoportba az azonos  $K_E$  (és ennek megfelelően azonos  $\tau$ ) értékkel rendelkező E/c görbék tartoztak (ami ebben a vizsgálatban egyben eltérő  $K$ -t is jelentett). A várakozásnak megfelelően a

nagyobb  $K_E(\tau)$  nagyobb  $E_{\max}$ -ot eredményezett, a nagyobb  $K$  jobbra tolta a függvényt, a nagyobb  $n_{op}$  pedig meredekebb görbelefutást okozott (4. A-C ábra).

Az *in silico* vizsgálatok harmadik szakaszában a szimulált agonisták saját  $E/c$  görbéi nem képeztek csoportokat, mivel minden agonistához egyedi  $K_E$ -t ( $\tau$ -t) rendeltünk. A  $K_E(\tau)$  és az  $n_{op}$  ugyanolyan hatással volt a függvényekre, mint az első és a második vizsgálati szakaszban (a  $K$ -t ebben a szakaszban egy értéken rögzítettük, vagyis a hatását nem vizsgáltuk) (4. D-F ábra).

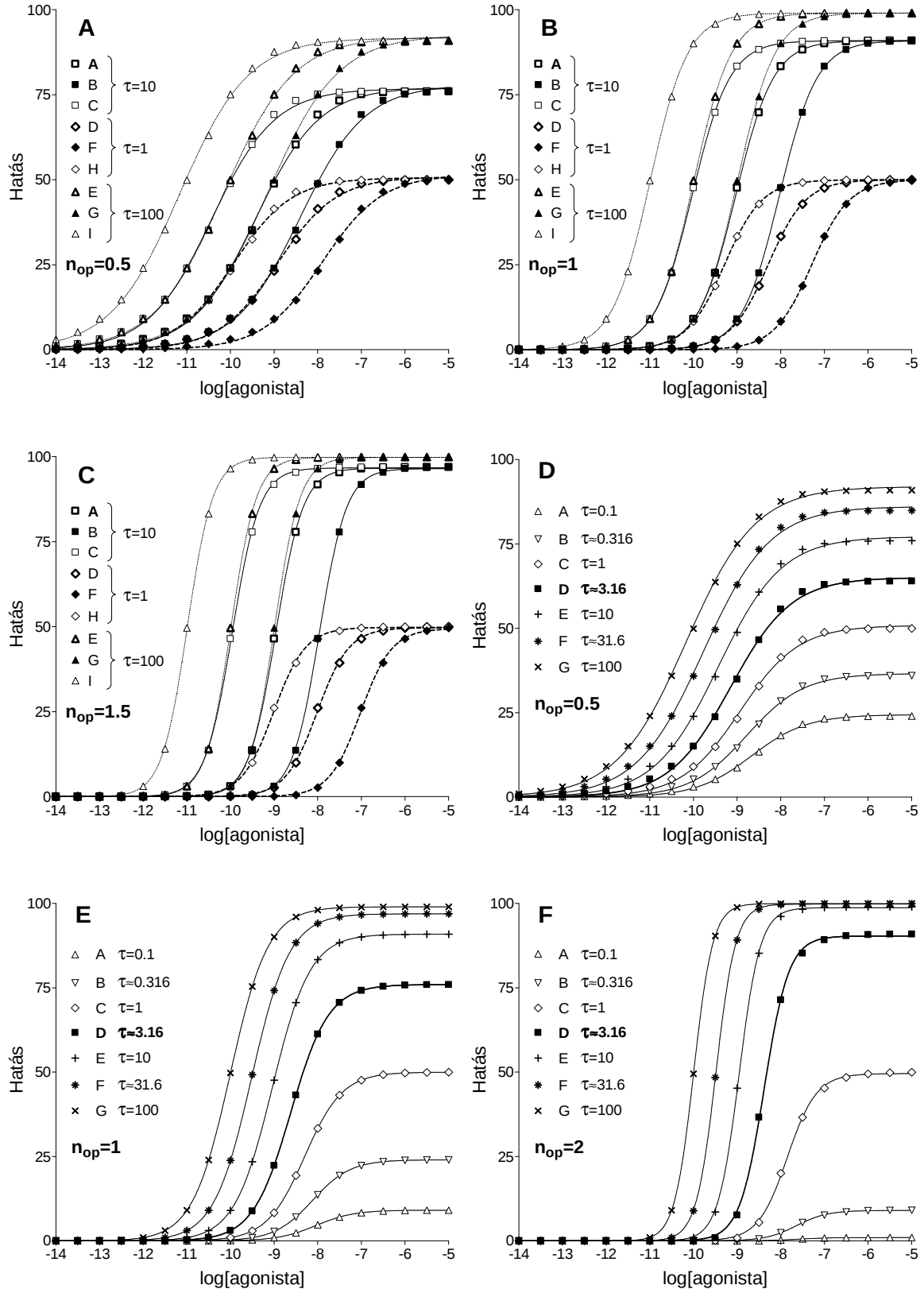
A harmadik szakaszban a Richards egyenlet (3.3. egyenlet) illeszkedése jobb volt a szimulált egyagonistás  $E/c$  görbékre, mint a Hill egyenleté (3.2. egyenlet). Az  $F$  teszt szerint  $n_{op} = 0.5$  illetve 2 esetén a Richards egyenlet volt a jobb modell,  $n_{op} = 1$  esetén viszont a Hill egyenlet (ennek oka, hogy az  $F$  teszt a modell bonyolultságát is figyelembe veszi az illeszkedése mellett). Ez egybevág azzal, hogy az 1-től különböző  $n_{op}$  aszimmetrikus függvényt határoz meg.

#### 4.2.2. Az RRM becslései a teszt agonista és a torzító agonista azonossága esetén

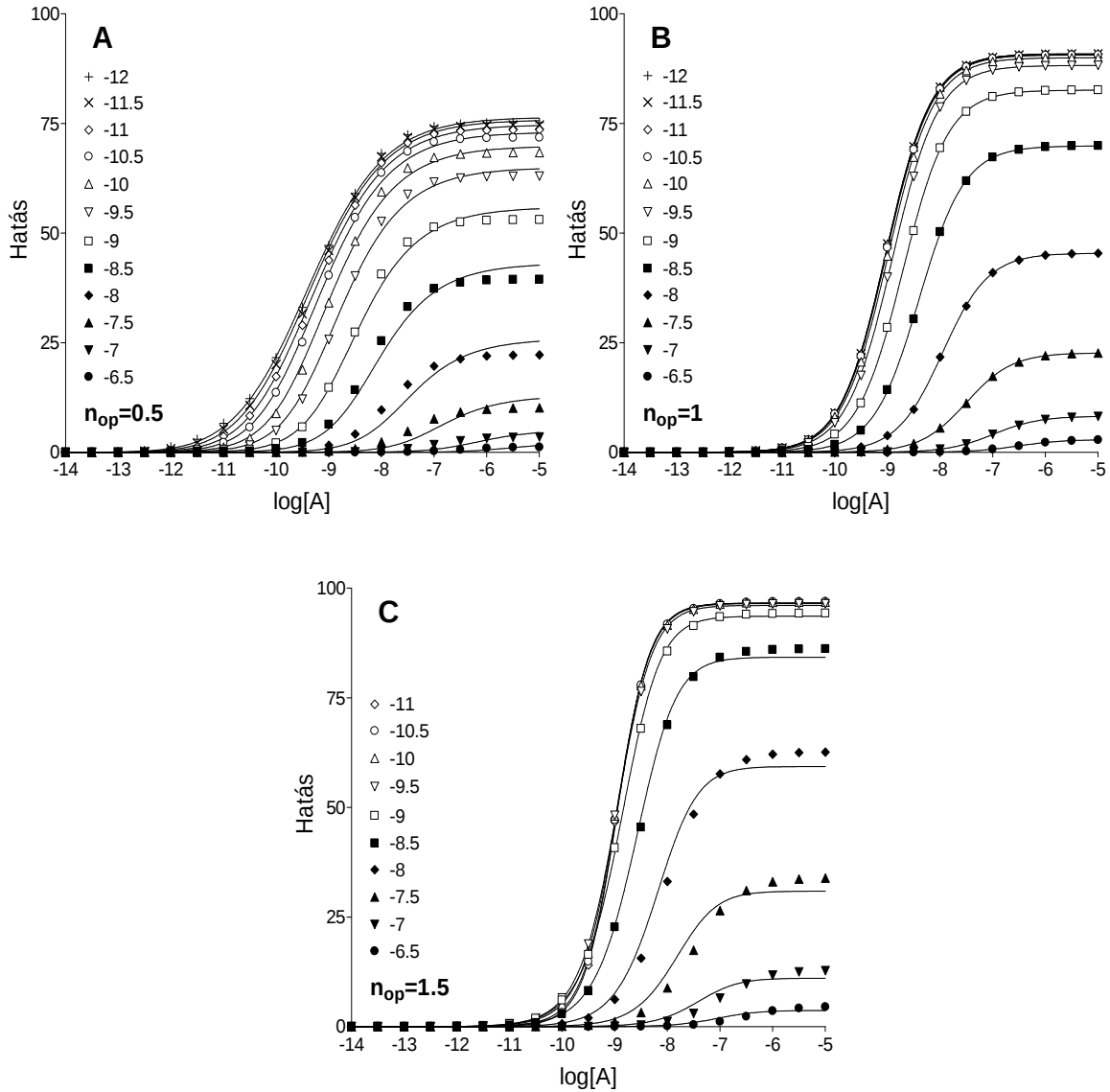
Az  $n_{op} = 0.5$  által jellemzett rendszerben az illesztett 3.8. egyenlet kis és közepes teszt agonista koncentrációknál ( $c_{test}$ ) az adatpontok alatt futott, míg nagy  $c_{test}$  értékeknél az adatpontok felett. Az illesztett 3.8. egyenlet lefutása tehát a torzított  $E/c$  görbe adatpontokhoz képest „alatta majd felette” jellegű volt (5. A ábra). Kis és közepes torzító agonista koncentrációknál ( $c_{bias}$ ) a becslés viszonylag pontos volt, nagyobb  $c_{bias}$  értékeknél azonban a becslések százalékos eltérése (ld.: 3.10. egyenlet) lényegesen meghaladta a 100%-ot (6. ábra).

A 3.8. egyenlet illeszkedése és a becslés  $n_{op} = 1$  esetén volt a legpontosabb. Az illesztett függvény láthatólag minden  $E/c$  görbe adatpontot tartalmazott (5. B ábra). A százalékos eltérés minden  $c_{bias}$  értéknél 0% és 100% között maradt, mi több, a két legkisebb  $c_{bias}$  kivételével nem haladta meg a 10%-ot (6. ábra).

Az  $n_{op} = 1.5$  rendszerben a görbeillesztés megghiúsult a két legkisebb  $c_{bias}$  érték esetében. Az illesztett 3.8. egyenlet „felette majd alatta” típusú lefutást mutatott (5. C ábra). Másrészről viszont a becslés csaknem ugyanolyan jó volt, mint  $n_{op} = 1$  mellett, a százalékos eltérés -100% és 10% között mozgott (6. ábra).



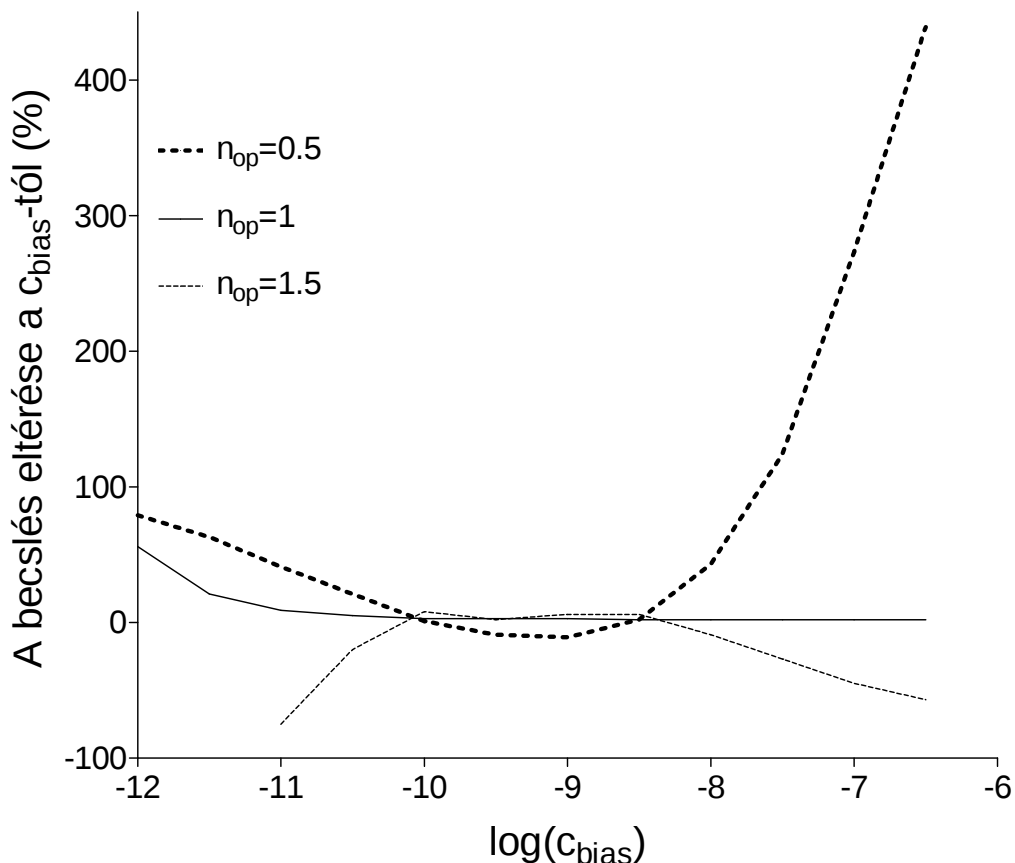
**4. ábra.** Az *in silico* vizsgálatok első két (A-C panelek) és harmadik (D-F panelek) szakaszában generált agonisták torzítatlan E/c görbéi három rendszerben (három  $n_{op}$ ). Az x tengely az agonista moláris koncentrációjának tízes alapú logaritmusát tünteti fel, az y tengely a hatást. A szimbólumok az agonistákat mutatják, a vonalak pedig az illesztett Hill egyenletet. A későbbi teszt agonista az első két szakaszban az A jelzésű volt (A-C panelek), míg a harmadikban a D (D-F panelek).



**5. ábra.** Az első két *in silico* kísérleti szakasz A jelzésű agonistájának E/c görbéi ugyanazon agonista különböző nagyságú torzító koncentrációinak jelenlétében három különböző  $n_{op}$  mellett. Az x tengely a teszt agonista moláris koncentrációjának tízes alapú logaritmusát tünteti fel, míg az y tengely a hatást. A szimbólumok a torzult E/c görbe adatpontokat jelzik (a torzító koncentrációk tízes alapú logaritmusát az ábra bal oldalán tüntettük fel), a vonalak pedig az illesztett 3.8. egyenletet.

Az RRM a kisebb és a nagyobb  $c_{bias}$  értékeket túlbecsülte  $n_{op} = 0.5$  esetén, ugyanakkor alulbecsülte  $n_{op} = 1.5$  mellett. Ezzel szemben  $n_{op} = 1$  esetében gyakorlatilag csak a legkisebb  $c_{bias}$ -t becsülte túl (6. ábra).

A görbeillesztés precizitása és a becslés pontossága között csak laza korreláció mutatkozott (vö.: 5. és 6. ábra).



**6. ábra.** A becslési pontosság függése a torzító koncentrációtól ( $c_{\text{bias}}$ ) és az operatív meredekségi tényezőtől ( $n_{\text{op}}$ ) az *in silico* vizsgálatok első szakaszában. Az x tengely a  $c_{\text{bias}}$  tízes alapú logaritmusát mutatja, az y tengely pedig a becslés százalékos eltérését a meghatározandó  $c_{\text{bias}}$  értéktől.

#### 4.2.3. Az RRM becslései a teszt agonista és a torzító agonista különbözősége esetén

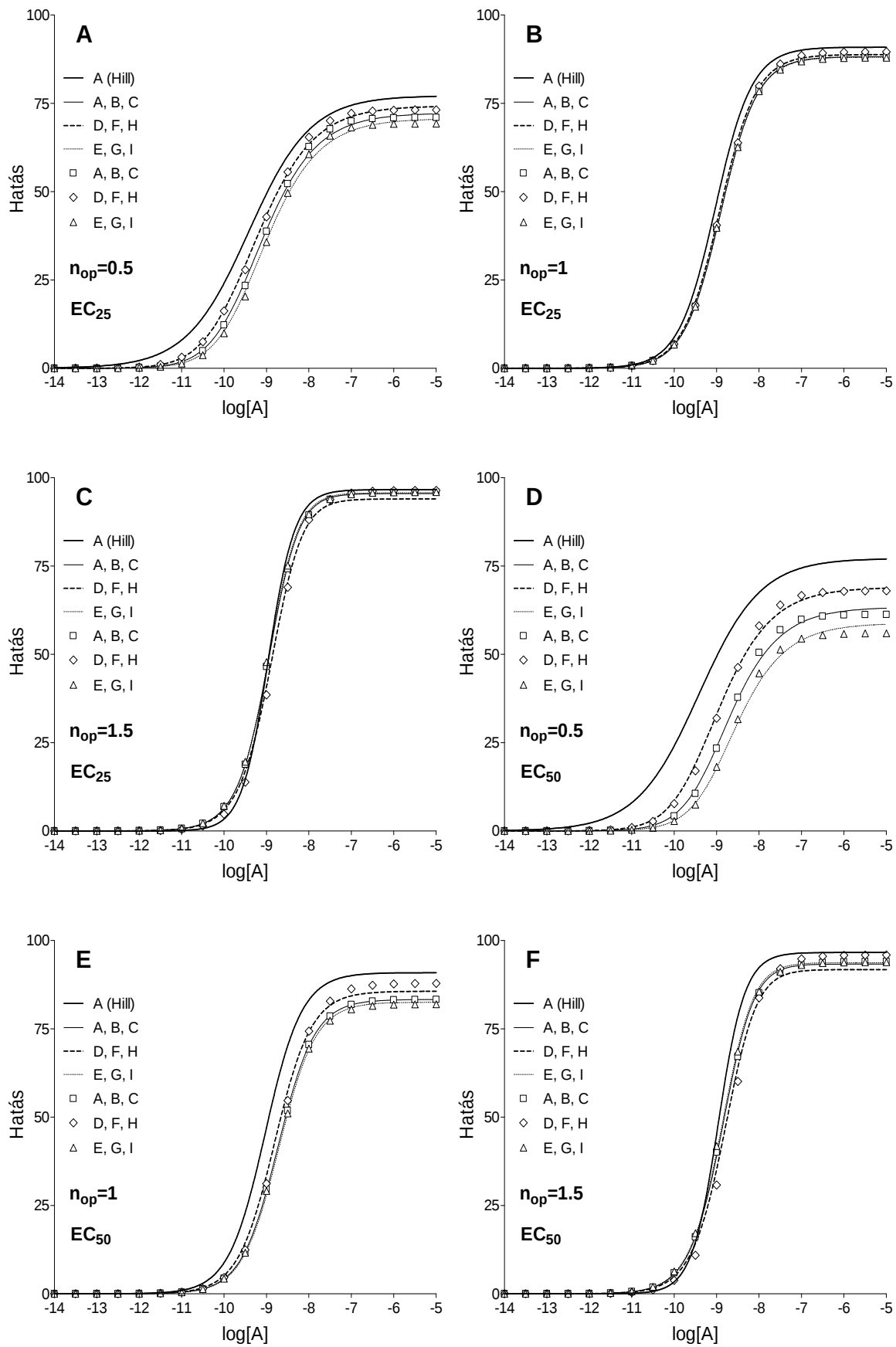
A második vizsgálati szakasz agonistáit operatív hatékonyságuk ( $\tau = [R_0]/K_E$ ) alapján a következő csoportokba sorolhattuk: A, B, C csoport ( $\tau = 10$ ); D, F, H csoport ( $\tau = 1$ ); és E, G, I csoport ( $\tau = 100$ ). Ez megegyezik a csoportosítással, amelyet az agonisták saját E/c görbéinek  $E_{\text{max}}$ -a alapján tehetünk meg (vö.: 4. A-C ábra). E csoportosítás jelentőségét aláhúzza, hogy az RRM az ugyanakkora  $\tau$ -val (vagyis  $K_E$ -vel) rendelkező agonisták ugyanazon torzító koncentrációit ( $EC_{25}$ ,  $EC_{50}$  illetve  $EC_{75}$ ) ugyanabban a rendszerben (egyező  $n_{\text{op}}$  mellett) ugyanazzal a  $c_x$  értékkel jellemezte. Megállapíthatjuk tehát, hogy az

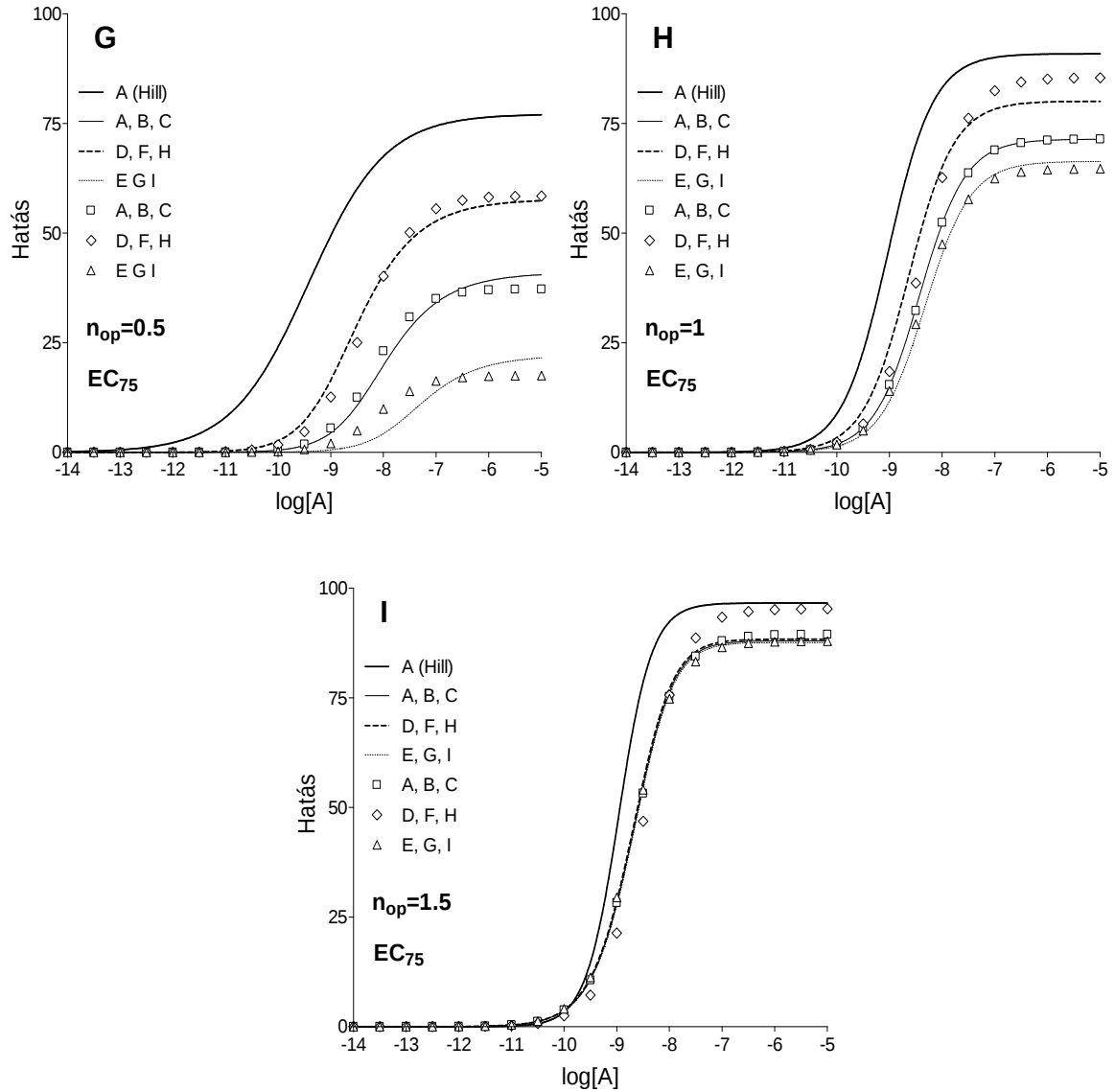
affinitás nem befolyásolta a kapott  $c_x$  értékeket. Amikor a közös  $c_x$ -ből becslést számoltunk, ez utóbbiak csak a nagyságrendjükben különböztek egymástól, a torzító agonistákhoz tartozó  $K_{bias}$  értékeknek megfelelően. Az egyes agonistacsoportok tehát a görbeillesztés és a becslés szempontjából egységként viselkedtek.

A teszt agonista és a torzító agonista operatív hatékonyságát ezek arányával egyszerre vehettük figyelembe:  $\tau_{bias}/\tau_{test}$ . A 3.8. egyenlet legjobb illeszkedését és a legpontosabb becslést az A, B, C csoport ( $\tau_{bias}/\tau_{test} = 1$ ) esetében tapasztaltuk  $n_{op} = 1$  mellett (az eltérés a  $c_{bias}$ -tól 2-3% volt). Az  $n_{op}$  csökkentése „alatta majd felette” jellegűvé tette az illesztett 3.8. egyenletet, míg az  $n_{op}$  növelése „felette majd alatta” típusúvá, különösen nagyobb  $c_{bias}$  értékeknél. Ezzel összhangban a becslési pontosság is romlott az  $n_{op} = 1$  rendszerben tapasztaltakhoz képest, de még viszonylag jó maradt (az eltérés a  $c_{bias}$ -tól  $\pm 20\%$ -on belül volt  $n_{op} = 0.5$  mellett, míg  $\pm 10\%$ -on belül alakult  $n_{op} = 1.5$  mellett) az A, B, C csoport esetében (7., 8. ábra).

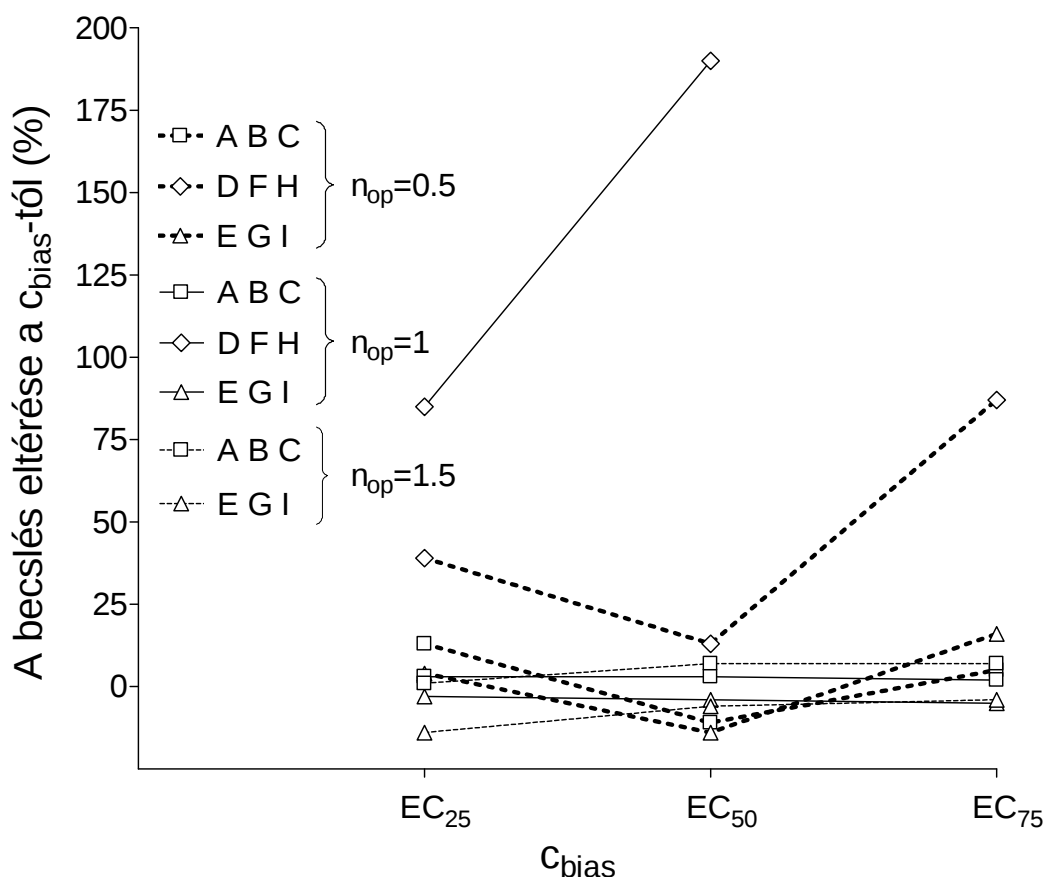
A D, F, H csoportnál ( $\tau_{bias}/\tau_{test} = 0.1$ )  $n_{op} = 1$  esetén az illesztett 3.8. egyenlet „felette majd alatta” típusú lett, amely még kifejezettebbé vált az  $n_{op} = 1.5$  rendszerben. Ezzel szemben  $n_{op} = 0.5$  esetén a görbe illeszkedése megjavult, a „felette majd alatta” jelleg csak nagyobb  $c_{bias}$  értékeknél jelentkezett. Ezzel összhangban az  $n_{op} = 1$  és az  $n_{op} = 1.5$  rendszerekben az RRM durván túlbecsülte a  $c_{bias}$  értékeket, de csak mérsékelten mért fölējük az  $n_{op} = 0.5$  rendszerben (az eltérés 10% és 100% között volt) (7., 8. ábra). Nagyobb  $c_{bias}$  és egyidejűleg nagyobb  $n_{op}$  esetén a kapott  $c_x$ -ből nem lehetett becslést számolni, mivel a  $c_x$ -hez tartozó hatás ( $E_x$ ) meghaladta a torzító agonista saját E/c görbéjének  $E_{max}$ -át.

Az E, G, I csoportnál ( $\tau_{bias}/\tau_{test} = 10$ )  $n_{op} = 1$  mellett a 3.8. egyenlet illeszkedése viszonylag jó volt, nagyobb  $c_{bias}$  értékeknél azonban „alatta majd felette” jellegűvé vált. Az  $n_{op}$  csökkentése rontotta, míg növelése javította (csaknem tökéletessé tette) az illeszkedést, szemben a D, F, H csoportban látott viselkedéssel. Az E, G, I csoportnál a becslési pontosság viszonylag jó volt, a  $c_{bias}$ -tól való eltérés -20% és 20% között alakult  $n_{op} = 0.5$  esetén, -10% és 0% között volt  $n_{op} = 1$  mellett, továbbá -20% és 0% között volt  $n_{op} = 1.5$  esetében (7., 8. ábra).





**7. ábra.** A első két *in silico* kísérleti szakasz A jelzésű agonistájának E/c görbéi az ugyanitt definiált agonisták (A-I) különböző nagyságú torzító koncentrációinak jelenlétében három különböző  $n_{op}$  mellett. Az x tengely a teszt agonista moláris koncentrációjának tízes alapú logaritmusát mutatja, míg az y tengely a hatást. A szimbólumok a torzított E/c görbe adatpontokat jelzik. A torzító agonistákat az ábra bal oldalán fent illetve középen tüntettük fel, a torzító koncentrációt pedig az ábra bal oldalán lent jeleztük. A vastag, szimbólumok nélküli folytonos vonal az A agonista torzítatlan, egyagonistas E/c görbéjére illesztett Hill egyenletet mutatja (az adott rendszerben). A többi vonal az agonistacsoportok által torzított E/c görbékre illesztett 3.8. egyenletet jeleníti meg.



**8. ábra.** A becslési pontosság függése a torzító koncentrációtól ( $c_{bias}$ ), az operatív meredekségi tényezőtől ( $n_{op}$ ) és az operatív hatékonyságtól ( $\tau$ ) az *in silico* vizsgálatok második szakaszában. Az x tengely a három vizsgált  $c_{bias}$  értéket mutatja (önkéntesen egyenlő távolságra egymástól a szomszédos értékeket), az y tengely pedig a becslések százalékos eltérését a meghatározandó  $c_{bias}$  értékektől. A szimbólumok a csoportonként közös százalékos eltéréseket jelzik az egyes torzító agonisták esetében, melyeket az ábra bal oldalán magyaráztunk meg.

#### 4.2.4. A *E/c* görbe aszimmetria figyelembevételének hatása az RRM becsléseire

Az *in silico* vizsgálatok harmadik szakasza során a Hill illetve a Richards egyenletet magába foglaló RRM becslései megegyeztek, amikor a torzult *E/c* görbék szimmetrikusak voltak ( $n_{op} = 1$ ). Az  $n_{op} = 0.5$  rendszerben a Richards modellt tartalmazó RRM általában (bár nem mindig) pontosabb volt, mint a Hill modellből kiinduló RRM. Érdekes módon  $n_{op} = 2$  mellett a Richards modellt tartalmazó RRM rendre ugyanolyan vagy némileg pontatlanabb becslésekkel szolgált, mint a Hill egyenletet tartalmazó. Mindent egybevetve, az aszimmetrikus

E/c görbék ( $n_{op} \neq 1$ ) vizsgálata során nem találtunk átütő különbséget a kétféle modellt tartalmazó RRM becslései között (2. táblázat).

A D agonista ( $\tau_{bias}/\tau_{test} = 1$ ) meghatározása során az  $n_{op} = 1$  rendszerben tökéletes becsléseket kaptunk, a százalékos eltérés minden  $c_{bias}$  esetében 0% volt (2. táblázat; 10. ábra). Ezzel összhangban az illesztett 3.8. illetve 3.9. egyenlet láthatóan az összes E/c görbe adatpontot tartalmazta (9. A-C, E, G ábra). Más agonisták és más rendszerek esetében a becslési pontosság és az illeszkedés általában rosszabb volt (2. táblázat; 9. ábra).

A  $\tau_{bias}/\tau_{test}$  arány növelése az illesztett 3.8. illetve 3.9. egyenletet egyaránt az „alatta majd felette” jelleg irányába módosította, a  $\tau_{bias}/\tau_{test}$  arány csökkentése pedig „felette majd alatta” irányába (a 3.8. egyenlet esetében ez különösen jól látszik a 9. E ábrán). Az  $n_{op}$  növelése ugyanakkor az illesztett 3.8. illetve 3.9. egyenletet „felette majd alatta” irányába transzformálta (9. A, B, D, F, I ábra), az  $n_{op}$  csökkentése pedig „alatta majd felette” irányába (9. A, B, D, F, H ábra). A  $\tau_{bias}/\tau_{test}$  arány és az  $n_{op}$  ezen hatása additív volt, hasonlóan a második *in silico* vizsgálati szakaszban tapasztaltakhoz.

Az RRM egyenleteinek „alatta majd felette” típusú lefutása csaknem tökéletes becslési pontossággal járt. Ezzel szemben a „felette majd alatta” jellegű lefutás pontatlanabb becsléssel párosult, különösen, ha a 3.8. illetve a 3.9. egyenlet illeszkedése is feltűnően rossz volt (9., 10. ábra; 2. táblázat).

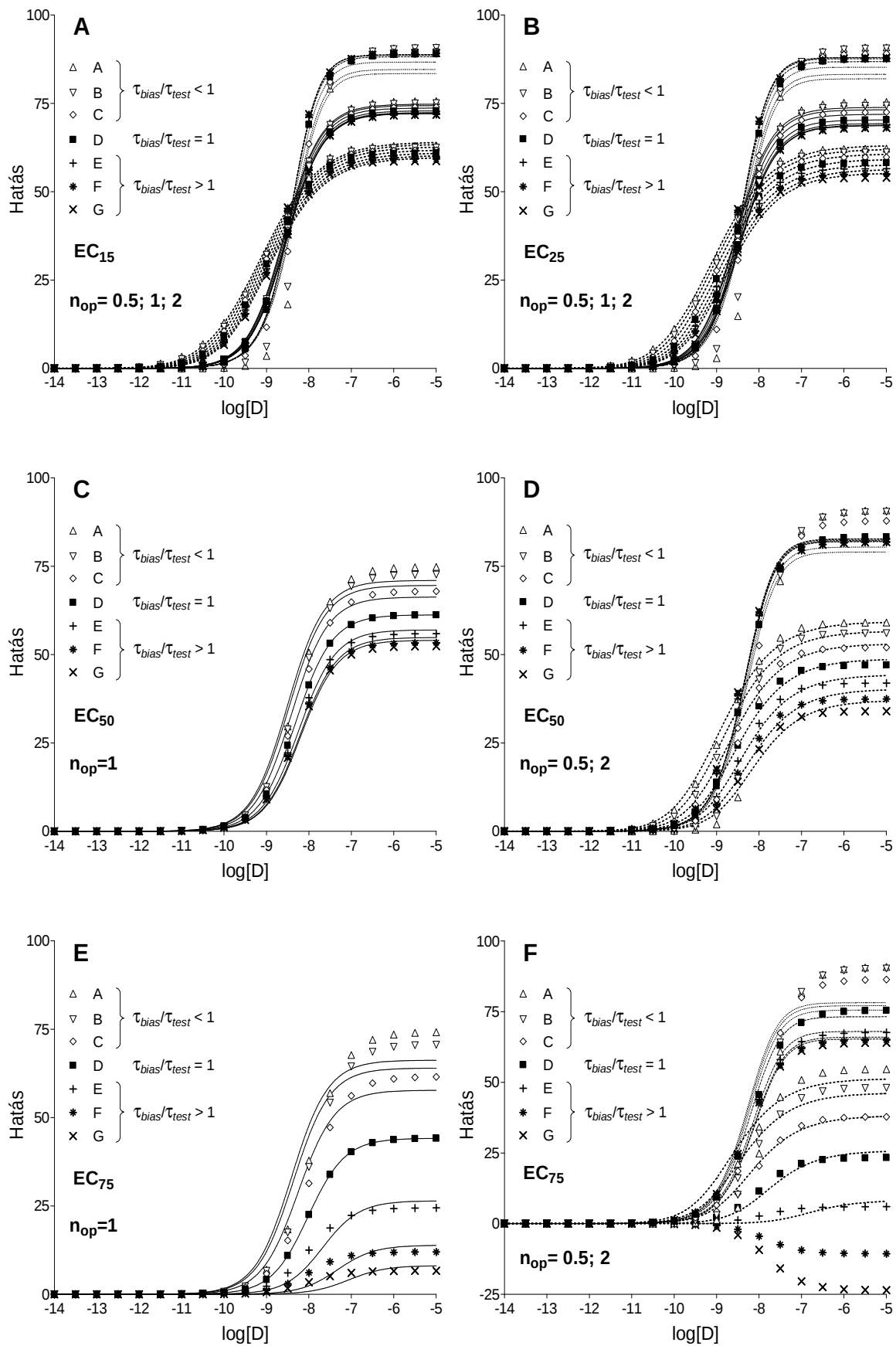
A koncentráció-becslés néhány esetben megghiúsult az alábbi két ok valamelyikéből kifolyólag:

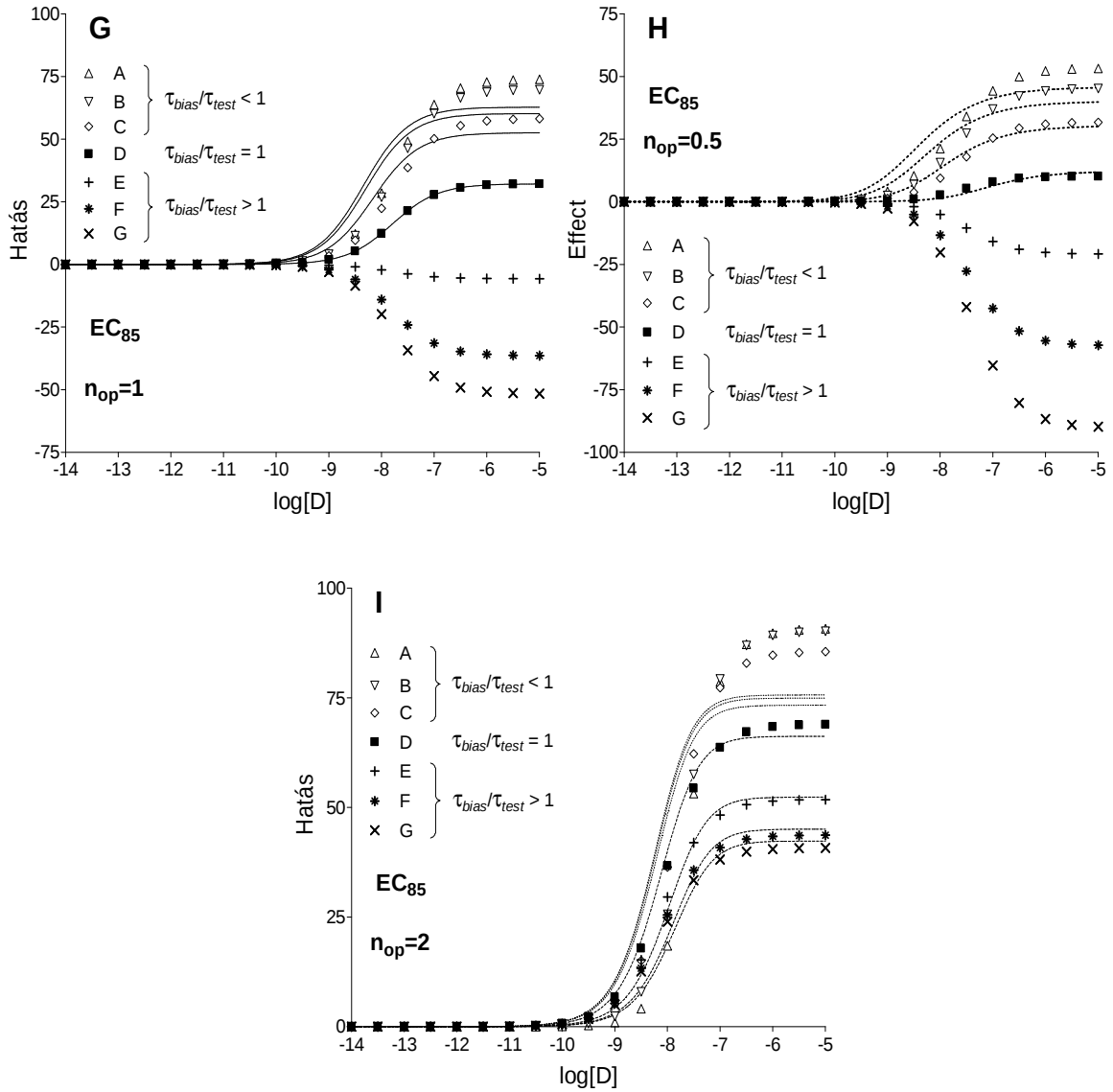
1. Az  $E_x$ -hez (a  $c_x$  hatása) nem lehetett torzító agonista koncentrációt találni, mivel  $E_x$  nagyobb volt, mint a torzító agonista saját E/c görbéjének  $E_{max}$ -a. Ez olyankor fordulhatott elő, ha a  $\tau_{bias}/\tau_{test}$  arány kicsi volt, az  $n_{op}$  pedig nagy, ami miatt az RRM túlbecsülte a  $c_x$ -et. Ez a hiba a szimulációs vizsgálatok második szakaszában is előfordult. Néhány esetben a Richards modell alkalmazása (3.9. egyenlet) kivédte ezt a problémát, de többnyire nem (2. táblázat: „szám.” hibajelzés).

2. Az RRM egyenleteit nem lehetett illeszteni, így nem sikerült  $c_x$ -et nyerni. Ilyen probléma bonyolult egyenleteknél gyakran előfordul és a regressziós paraméterek kiindulási értékeit módosítva sokszor megoldható. A mi esetünkben

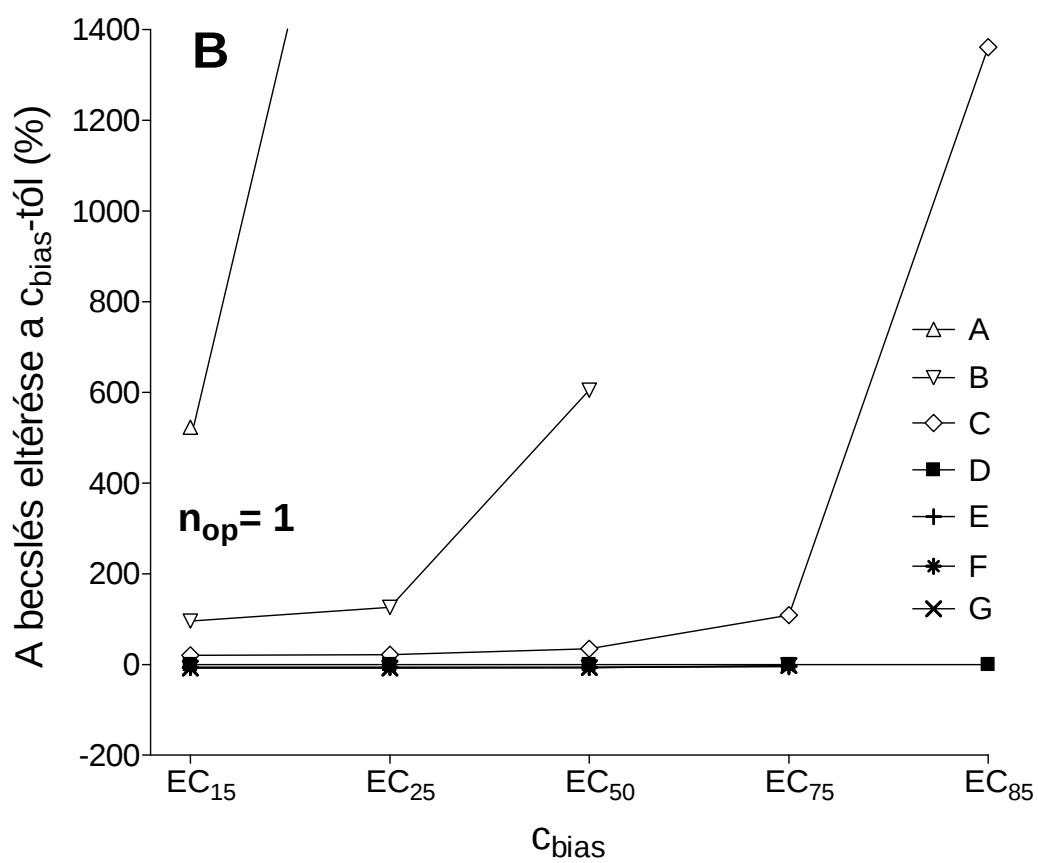
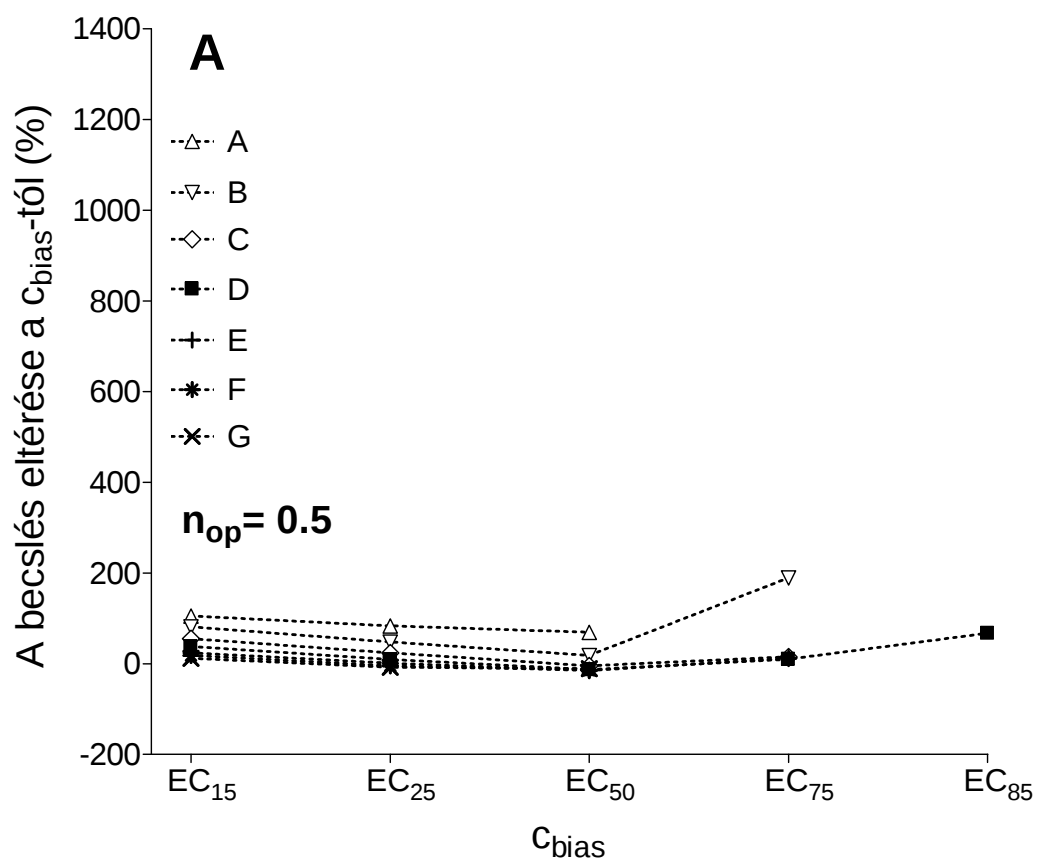
azonban megoldhatatlan akadályt jelentett a torzult E/c görbék negatív y tartományba kanyarodó lefutása, ami olyankor fordulhatott elő, ha a  $\tau_{\text{bias}}/\tau_{\text{test}}$  arány és a  $c_{\text{bias}}$  nagy volt, az  $n_{\text{op}}$  pedig kicsi (9. F-H ábra). A Richards modell alkalmazása egyáltalán nem befolyásolta ezt a hibát (2. táblázat: „ill.” hibajelzés).

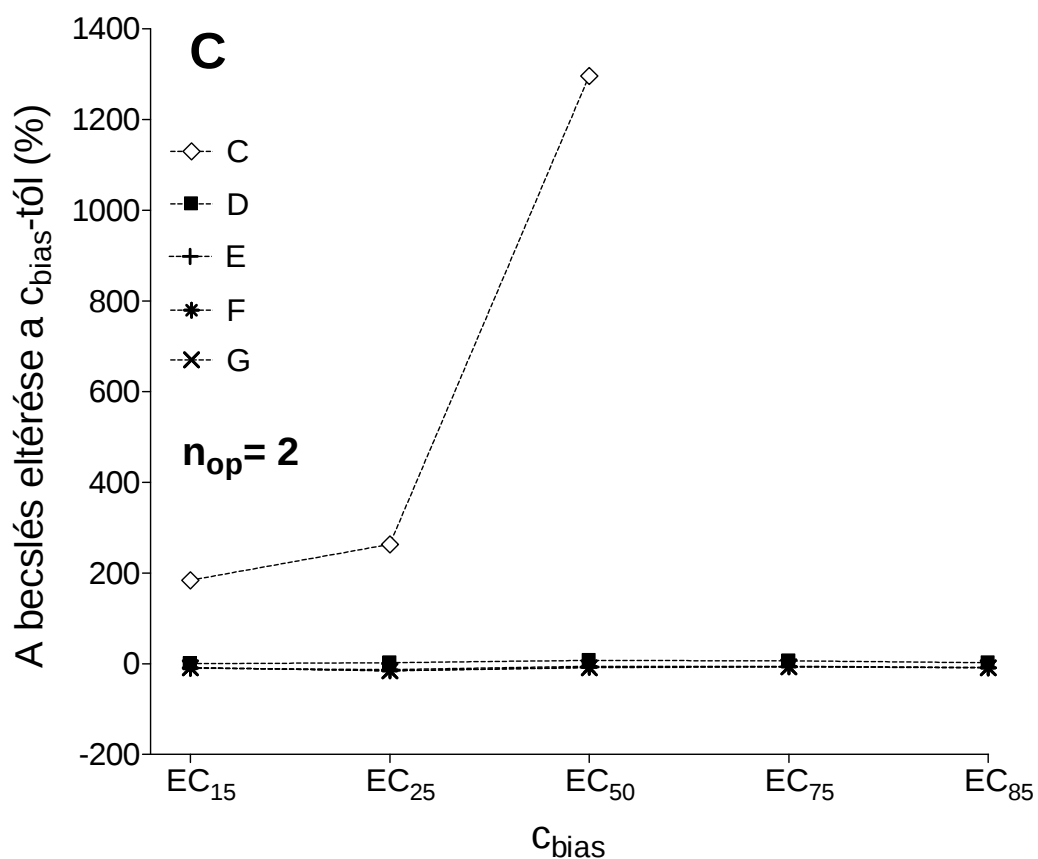
A harmadik szakasz során tehát bebizonyosodott, hogy a  $\tau_{\text{bias}}/\tau_{\text{test}} \neq 1$  és/vagy  $n_{\text{op}} \neq 1$  okozta görbeilleszkedési torzulás (9. ábra), csakúgy, mint a becslési pontosság ehhez kapcsolódó változása (2. táblázat), lényegében nem védhető ki a E/c görbék aszimmetriájának figyelembe vételével.





**9. ábra.** A harmadik *in silico* kísérleti szakasz D jelzésű agonistájának E/c görbéi az ugyanitt definiált agonisták (A-G) különböző nagyságú torzító koncentrációinak jelenlétében három különböző  $n_{op}$  mellett. Az x tengely a teszt agonista moláris koncentrációjának tízes alapú logaritmusát mutatja, míg az y tengely a hatást. A szimbólumok a torzított E/c görbe adatpontokat jelzik. A torzító agonistákat és a hozzájuk tartozó  $\tau_{bias}/\tau_{test}$  arányt az ábra bal oldalán fent tüntettük fel, a torzító koncentrációt pedig az ábra bal oldalán középen jeleztük (a H panel kivételével, ahol fordítva). A vonalak a torzított E/c görbékre illesztett 3.8. egyenletet jelentik meg. A folytonos vonalak az  $n_{op} = 1$  rendszert mutatják; a vastag szaggatott vonalak az  $n_{op} = 0.5$  rendszert; míg a vékony szaggatott vonalak az  $n_{op} = 2$  rendszert. A vékony szaggatott vonalak esetében a rövid pontok  $\tau_{bias}/\tau_{test} < 1$  arányt jelentenek, a hosszabb pontok pedig  $\tau_{bias}/\tau_{test} \geq 1$  arányt.





**10. ábra.** A Hill modellen alapuló RRM becslési pontosságának függése a torzító koncentrációtól ( $C_{bias}$ ), az operatív meredekségi tényezőtől ( $n_{op}$ ) és az operatív hatékonyságtól ( $\tau$ ) az *in silico* vizsgálatok harmadik szakaszában. Az x tengely az öt vizsgált  $C_{bias}$  értéket mutatja (önkéntesen egyenlő távolságra egymástól a szomszédos értékeket), az y tengely pedig a becslések százalékos eltérését a keresett  $C_{bias}$  értékektől. A szimbólumok a százalékos eltéréseket jelzik az egyes torzító agonisták esetében, melyeket az ábra bal (A, C panel) illetve jobb (B panel) oldalán tüntettünk fel.

| $c_{\text{bias}} = EC_{15}$             |                         | <b>A</b>        | <b>B</b> | <b>C</b>       | <b>D</b>  | <b>E</b>      | <b>F</b> | <b>G</b>     |
|-----------------------------------------|-------------------------|-----------------|----------|----------------|-----------|---------------|----------|--------------|
| $\tau_{\text{bias}}/\tau_{\text{test}}$ |                         | $\approx 0.032$ | $0.1$    | $\approx 0.32$ | <b>1</b>  | $\approx 3.2$ | $10$     | $\approx 32$ |
| $n_{\text{op}} = 0.5$                   | <b>Hill</b>             | 105             | 81       | 55             | <b>38</b> | 24            | 18       | 12           |
|                                         | <b>Richards</b>         | -15             | -10      | -4             | <b>-2</b> | 1             | 3        | 2            |
| $n_{\text{op}} = 1$                     | <b>Hill és Richards</b> | 523             | 96       | 20             | <b>0</b>  | -6            | -7       | -8           |
| $n_{\text{op}} = 2$                     | <b>Hill</b>             | szám.           | szám.    | 184            | <b>0</b>  | -10           | -9       | -9           |
|                                         | <b>Richards</b>         | szám.           | szám.    | 203            | <b>-3</b> | -16           | -17      | -13          |

| $c_{\text{bias}} = EC_{25}$             |                         | <b>A</b>        | <b>B</b> | <b>C</b>       | <b>D</b>  | <b>E</b>      | <b>F</b> | <b>G</b>     |
|-----------------------------------------|-------------------------|-----------------|----------|----------------|-----------|---------------|----------|--------------|
| $\tau_{\text{bias}}/\tau_{\text{test}}$ |                         | $\approx 0.032$ | $0.1$    | $\approx 0.32$ | <b>1</b>  | $\approx 3.2$ | $10$     | $\approx 32$ |
| $n_{\text{op}} = 0.5$                   | <b>Hill</b>             | 83              | 48       | 24             | <b>9</b>  | 1             | -5       | -8           |
|                                         | <b>Richards</b>         | 1               | 2        | 5              | <b>4</b>  | 4             | 3        | 2            |
| $n_{\text{op}} = 1$                     | <b>Hill és Richards</b> | 2332            | 126      | 22             | <b>0</b>  | -6            | -7       | -8           |
| $n_{\text{op}} = 2$                     | <b>Hill</b>             | szám.           | szám.    | 263            | <b>2</b>  | -13           | -16      | -16          |
|                                         | <b>Richards</b>         | szám.           | szám.    | 251            | <b>-3</b> | -19           | -22      | -23          |

| $c_{\text{bias}} = EC_{50}$             |                         | <b>A</b>        | <b>B</b> | <b>C</b>       | <b>D</b>   | <b>E</b>      | <b>F</b> | <b>G</b>     |
|-----------------------------------------|-------------------------|-----------------|----------|----------------|------------|---------------|----------|--------------|
| $\tau_{\text{bias}}/\tau_{\text{test}}$ |                         | $\approx 0.032$ | $0.1$    | $\approx 0.32$ | <b>1</b>   | $\approx 3.2$ | $10$     | $\approx 32$ |
| $n_{\text{op}} = 0.5$                   | <b>Hill</b>             | 69              | 18       | -5             | <b>-13</b> | -15           | -14      | -11          |
|                                         | <b>Richards</b>         | 59              | 27       | 10             | <b>0</b>   | -4            | -7       | -7           |
| $n_{\text{op}} = 1$                     | <b>Hill és Richards</b> | szám.           | 605      | 35             | <b>0</b>   | -6            | -7       | -7           |
| $n_{\text{op}} = 2$                     | <b>Hill</b>             | szám.           | szám.    | 1296           | <b>7</b>   | -6            | -8       | -9           |
|                                         | <b>Richards</b>         | szám.           | szám.    | 835            | <b>0</b>   | -12           | -14      | -15          |

| $c_{\text{bias}} = EC_{75}$             |                         | <b>A</b>        | <b>B</b> | <b>C</b>       | <b>D</b>  | <b>E</b>      | <b>F</b> | <b>G</b>     |
|-----------------------------------------|-------------------------|-----------------|----------|----------------|-----------|---------------|----------|--------------|
| $\tau_{\text{bias}}/\tau_{\text{test}}$ |                         | $\approx 0.032$ | $0.1$    | $\approx 0.32$ | <b>1</b>  | $\approx 3.2$ | $10$     | $\approx 32$ |
| $n_{\text{op}} = 0.5$                   | <b>Hill</b>             | szám.           | 189      | 15             | <b>10</b> | 12            | ill.     | ill.         |
|                                         | <b>Richards</b>         | szám.           | 654      | 29             | <b>-2</b> | 0             | ill.     | ill.         |
| $n_{\text{op}} = 1$                     | <b>Hill és Richards</b> | szám.           | szám.    | 109            | <b>0</b>  | -5            | -3       | -2           |
| $n_{\text{op}} = 2$                     | <b>Hill</b>             | szám.           | szám.    | szám.          | <b>6</b>  | -6            | -7       | -7           |
|                                         | <b>Richards</b>         | szám.           | szám.    | szám.          | <b>3</b>  | -6            | -7       | -7           |

| $c_{\text{bias}} = EC_{85}$             |                  | A               | B     | C              | D  | E             | F    | G            |
|-----------------------------------------|------------------|-----------------|-------|----------------|----|---------------|------|--------------|
| $\tau_{\text{bias}}/\tau_{\text{test}}$ |                  | $\approx 0.032$ | 0.1   | $\approx 0.32$ | 1  | $\approx 3.2$ | 10   | $\approx 32$ |
| $n_{\text{op}} = 0.5$                   | Hill             | szám.           | szám. | szám.          | 67 | ill.          | ill. | ill.         |
|                                         | Richards         | szám.           | szám. | 2117           | 8  | ill.          | ill. | ill.         |
| $n_{\text{op}} = 1$                     | Hill és Richards | szám.           | szám. | 1361           | 0  | ill.          | ill. | ill.         |
| $n_{\text{op}} = 2$                     | Hill             | szám.           | szám. | szám.          | 2  | -9            | -9   | -9           |
|                                         | Richards         | szám.           | szám. | szám.          | 3  | -6            | -6   | -6           |

**2. táblázat.** A Hill illetve a Richards egyenletet tartalmazó RRM pontosságának összehasonlítása a becsléseknek a torzító koncentrációtól ( $c_{\text{bias}}$ ) való százalékos eltérése alapján az *in silico* vizsgálatok harmadik szakaszában. A táblázatok legfelső sorában a torzító agonistákat tüntettük fel. Teszt agonistaként a D agonistát használtuk. Sötétszürke háttér: a becslés százalékos eltérése a -10 és 10 között volt; világosszürke háttér: a becslés százalékos eltérése -100 és 100 között volt, de kívül esett a -10 és 10 intervallumon. Rövidítések: szám. - „számolási hiba”, vagyis az illesztéssel kapott  $c_x$ -ből nem lehetett becslést számolni; ill. - „illesztési hiba”, vagyis az RRM egyenletét nem lehetett a torzított E/c görbékre illeszteni.

## 5. Megbeszélés

### 5.1. A thyreoid hormonok és az ADA gátlók interakciója a tengerimalac bal pitvari adenozinerg rendszeren

Az adenzin fontos szerepet tölt be a szívizom ischaemiával illetve hypoxiával szembeni védelmében. Az interstitialis adenzin elsősorban sejtfelszíni adenzin receptorok közvetítésével fejt ki protektív hatását, melyek közül az A<sub>1</sub> és az A<sub>3</sub> receptorok játsszák a fő szerepet (De Jong és mtsai, 2000; Peart és Headrick, 2007; Headrick és Lasley, 2009). A szövetek adenzin-tartalma adaptív módon jelentősen megnő ischaemia és hypoxia során (Sommerschield és Kirkeboen, 2000). Az adenzin patológiás körülmények között érvényesülő szabályozó szerepét támasztja alá az a vizsgálat is, mely szerint ischaemiás szívbetegség vérelemezkeinek sejtfelszíni multienzim komplexében fokozódott az ATP-t, ADP-t és AMP-t bontó enzimek (ekto-nukleozid trifoszfát foszfohidroláz, ekto-nukleotid pirofoszfátáz és ekto-5'-nukleotidáz) mennyisége, míg az ADA expressziója visszaszorult, ami növeli az adenzin kínálatot (Bagatini és mtsai, 2011). Ez a megfigyelés is aláhúzza azon vizsgálatok jelentőségét, melyek célja az ADA szívben betöltött szerepének pontos feltérképezése.

Ismert, hogy az ADA gátlása szignifikánsan növeli a szív adenzin-tartalmát (Sandhu és mtsai, 1993; Silva és mtsai, 1995; Manthei és mtsai, 1998). Jóllehet tengerimalac szívben ADA csak intracellulárisan fordul elő (Schutz és mtsai, 1981), a szívre jellemző erőteljes ekvibratív nukleozid transzport mellett (Conant és Jarvis, 1991) az ADA gátlása szükségszerűen emeli az interstitialis adenzin-szintet is. Ez alapján feltételezhető lenne, hogy az ADA gátlás hatására felszaporodó interstitialis adenzin csökkenti az A<sub>1</sub> receptorok válaszkészségét egy későbbi stimulációval szemben, ahogy ezt korábban is tapasztaltuk a nukleozid transzport gátlás okozta interstitialis adenzin akkumuláció kapcsán (Gesztelyi és mtsai, 2003b; Karsai és mtsai, 2006). Ennek oka, hogy ha egy receptor környezetében a receptor agonistájának egy figyelmen kívül hagyott mennyisége van jelen, miközben az adott receptor stimulációja révén egy E/c

görbe kerül felvételre, a detektált hatás kisebb lesz az intakt állapotban tapasztalhatóhoz képest (ld.: 2.1. alfejezet). A válaszkészség látszólagos gyengülése a E/c görbe  $E_{\max}$  értékének csökkenésében (a függvény lelapulásában) valamint  $EC_{50}$  értékének növekedésében (a függvény jobbra tolódásában) nyilvánul meg. A detektált hatás csökkenése a figyelmen kívül hagyott agonista koncentrációjának függvénye (Gesztelyi és mtsai, 2004). Ez alapján tehát ADA gátlás mellett a CPA-ra adott válasz csökkenését várhatnánk minden pitvaron. Ezzel szemben a jelen disszertáció első vizsgálata során azt találtuk, hogy a CPA negatív inotróp hatása fokozódott mind EHNA, mind DCF jelenlétében, igaz, kifejezett formában csak a hyperthyreoid pitvarokon (1. táblázat; 3. B ábra).

Ezen eredményünk megfelelő interpretációjához két fontos tényt kell figyelembe venni. Az egyik az, hogy a pitvarok kontrakciós ereje tartósan csökkent mind EHNA, mind DCF jelenlétében (1. ábra), melyet (legalábbis részben) az interstitialis adenosin-szint tartós növekedésével magyarázhatunk. A másik tény, hogy izolált, vértelen tengerimalac pitvaron a CPA eliminációja elég lassú (Gesztelyi és mtsai, 2004), melyet az ADA nem befolyásol, lévén a CPA ADA rezisztens (Pavan és IJzerman, 1998). A fentiek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy EHNA illetve DCF jelenlétében a szelektív  $A_1$  receptor agonista CPA-ra adott válasz növekedésének oka az  $A_1$  receptorok jelátviteli hatékonyságának (jelerősítésének) fokozódása.

Munkacsoportunk korábban már beszámolt arról, hogy a PDE2 gátló EHNA növelte az  $A_1$  receptor stimulációjával induló és a kontrakciós erőre konvergáló jelátvitel hatékonyságát hyperthyreoid tengerimalac pitvaron (Gesztelyi és mtsai, 2003b). Ennek köszönhetően EHNA jelenlétében a CPA E/c görbéje szignifikánsan magasabb  $E_{\max}$  értéket ért el és balra tolódott, legyőzve az interstitialis adenosin akkumuláció által okozott előzetes  $A_1$  receptor stimuláció hatását (ami a E/c görbét laposította és jobbra tolta volna). A szelektív (PDE inhibitor hatástól is mentes) ADA gátló DCF azonban szintén fokozta a CPA-ra adott inotróp választ  $T_4$  kezelt tengerimalac pitvaron, szignifikánsan balra tolva a CPA E/c görbét (1. táblázat; 3. B ábra). Mivel az  $E_{\max}$ -on túl az  $EC_{50}$  is függ az adott jelátvitel hatékonyságától (Black és Leff, 1983; Kenakin, 2004), ez arra utal, hogy az ADA gátlás önmagában is képes növelni az  $A_1$  receptor jelerősítését hyperthyreoid körülmények között (legalábbis az inotróp hatásra nézve).

Az ADA gátlás fő hatása a szöveti adenosin-tartalom növelése (Sandhu és mtsai, 1993; Silva és mtsai, 1995; Manthei és mtsai, 1998). Ebből kiindulva logikusan adódik a feltételezés, hogy az  $A_1$  receptor mediálta negatív inotrópia ADA gátlás okozta fokozódása az adenosin-többlet következménye. Ezt a feltevést támogatja az a korábbi megfigyelés is, mely szerint az elhúzódóan emelkedett adenosin-tartalom egy sor gén expresszióját befolyásolja a szívben, köztük a  $Ca^{2+}$  homeosztázisban résztvevő proteinek szintézisét is, melyek az  $A_1$  receptor jelátvitelének fontos szereplői (Headrick és mtsai, 2003; Peart és Headrick, 2007). Másrészt, az adenosin egyes bomlástermékeinek alacsonyabb szintje szintén hozzájárulhat az általunk megfigyelt jelenséghez. Mivel az ADA által termelt inozint korábban néhányan  $A_1$  receptor agonistának találták (Souza és mtsai, 2005), az ADA gátlás legegyszerűbb „hatásmechanizmusa” a mi kísérleti elrendezésünkben az lehetne, hogy a kevesebb inozin kevésbé stimulálja az  $A_1$  receptorokat a CPA E/c görbe felvétele előtt, így a CPA erősebb hatást hozhat létre. Ennek ellentmond azonban, hogy az inozinnak nagyon gyenge inotróp hatása volt a mi kísérleti körülményeink között (2. ábra). Emellett természetesen nem zárható ki az inozin (vagy más adenosin bomlástermék) mennyiségi csökkenésének hozzájárulása az ADA gátlás általunk vizsgált hatásához valamilyen más hatásmechanizmus révén.

Figyelemre méltó, hogy a jelen vizsgálatban az *in vivo*  $T_4$  és az *in vitro* ADA inhibitor kezelésre egyaránt szükség volt a pitvari  $A_1$  receptor inotróp funkciójának szignifikáns befolyásolásához (3. ábra). Ha az ADA aktivitása nagyobb lenne hyperthyreosisban, az nagyobb adenosin-szint emelkedést eredményezne ADA gátló jelenlétében, ami összeesene a fentebb említett feltételezésünkkel, miszerint az  $A_1$  receptor funkció ADA gátlás okozta fokozódása az adenosin-többlet következménye. A hyperthyreosisbeli ADA aktivitás-növekedésre azonban nem találtunk irodalmi adatot, sőt, egy vizsgálat során hyperthyreoid patkány szívben mérsékelten csökkent ADA aktivitást mértek (Smolenski és mtsai, 1995). Másrészt viszont a thyreoid hormonok növelik az L-típusú  $Ca^{2+}$ -áramot, a ryanodin-szenzitív  $Ca^{2+}$ -csatornák és a SERCA mennyiségét, továbbá csökkentetik a foszfolambán mennyiségét és aktivitását mind pitvaron, mind kamrán (Rubinstein és Binach, 1989; Mager és mtsai, 1992; Kreuzberg és mtsai, 2000; Arai és mtsai, 1991; Kaasik és mtsai, 1997; Shenoy és mtsai, 2001). Emellett a thyreoid hormonok csökkentik az  $A_1$  receptor agonisták hatékonyságát is a szívben

(Szentmiklósi és mtsai, 1992, Kaasik és mtsai, 1994). Ez alapján elképzelhető, hogy az adenosin jobban képes hatni a thyreoid hormonok által módosított mennyiségű és/vagy működésű  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztatikus fehérjékre (nem  $\text{A}_1$  receptor mediációval), melynek révén az ADA gátlás által megemelt adenosin koncentráció az euthyreoid érték felé tudja közelíteni a myocardialis  $\text{A}_1$  receptor (és/vagy a mögöttes jelátviteli utak) hyperthyreosisbeli csökkent érzékenységét.

A munkacsoport egy korábbi megfigyelése szerint a nukleozid transzport blokádjá, amely jól oxigenált szívben növeli az extracelluláris adenosin-szintet, de csökkenti az intracellulárisat (Deussen, 2000a, 2000b), csökkentette a CPA-ra adott inotróp választ mind eu-, mind hyperthyreoid pitvaron (Gesztelyi és mtsai, 2003b; Karsai és mtsai, 2007). Ez alapján az ADA gátlás következtében megemelkedő extracelluláris adenosin koncentráció nem tehető felelőssé a CPA fokozott hatásáért. Vagyis, véleményünk szerint az emelkedett intracelluláris adenosin-szint növekedése lehet a felelős az ADA gátlás jelen értekezésben vizsgált hatásáért.

A jelen disszertáció első vizsgálata során az EHNA-t  $100\ \mu\text{M}$  koncentrációban alkalmaztuk, szemben a korábban használt  $10\ \mu\text{M}$ -al (Gesztelyi és mtsai, 2003b), melynek célja az volt, hogy számottevően meghaladjuk az EHNA PDE2 inhibitor hatásának  $\text{EC}_{50}$  értékét. Ez az  $\text{EC}_{50}$  az irodalmi adatok szerint  $0.8$  és  $4.4\ \mu\text{M}$  között mozog humán, sertés és tengerimalac szívben illetve tüdőben (Podzuweit és mtsai, 1995; Ko és mtsai, 2004). Mivel ezek az értékek kb. két nagyságrenddel magasabbak, mint az EHNA ADA gátló hatásának  $\text{EC}_{50}$ -e (Terasaka és mtsai, 2003), az EHNA koncentrációjának  $100\ \mu\text{M}$ -ra emelése döntően a PDE2 gátló hatást erősíti (mivel az ADA gátló hatás már  $10\ \mu\text{M}$ -nál is gyakorlatilag maximális). Ezzel összhangban az EHNA erőteljesebben fokozta a CPA hatását a jelen értekezés első vizsgálatában, mint a korábbiiban (Gesztelyi és mtsai, 2003b). Jóllehet a DCF, amely PDE gátló hatás nélküli ADA inhibitor, potensebb, mint az EHNA ADA gátlóként (Terasaka és mtsai, 2003), a DCF-et is  $100\ \mu\text{M}$  koncentrációban alkalmaztuk. Ennek oka az EHNA és a DCF összehasonlíthatóságának minél tökéletesebb biztosítása volt, különös tekintettel a magas koncentrációból fakadó esetleges nem specifikus hatásokra.

A  $100\ \mu\text{M}$  EHNA szignifikánsan csökkentette mind az eu-, mind a hyperthyreoid állatokból származó pitvarok kontrakciós erejét (1. ábra), melynek

oka, legalábbis részben, az ADA gátlás miatt felszaporodott interstitialis adenzin ( $A_1$  receptor által mediált) negatív inotróp hatása lehet. A DCF jóval kevésbé gyengítette a pitvarokat (1. ábra), annak ellenére, hogy legalább olyan erős ADA inhibitor, mint az EHNA. Ez arra utal, hogy az EHNA okozta kontrakciós erő csökkenésnek más oka is van, mint az ADA gátlása. Ez a gyengítő hatás magyarázhatja, hogy az EHNA miatt csak a CPA maximális hatását növelte szignifikánsan (1. táblázat), noha 100  $\mu\text{M}$  EHNA, akárcsak 100  $\mu\text{M}$  DCF, gyakorlatilag teljes ADA gátlást képes létrehozni. Minden behatás ugyanis, ami csökkenti a kontrakciós erőt, egyidejűleg csökkenti minden (a kontrakciós erőt befolyásolni képes) receptor inotróp válaszkészségét is. Ez alapján feltételezhetjük, hogy az EHNA a CPA  $E_{\text{max}}$ -ának növelése mellett (ami, úgy tűnik, elsősorban a PDE2 gátló hatás következménye) a CPA  $EC_{50}$ -ét is csökkentené, de valamilyen nem specifikus (nem PDE2 gátló és nem ADA gátló) hatása csökkenti a pitvari kontrakciós erőt, és ezáltal a CPA-ra adható inotróp választ is. Ezzel szemben a DCF csak a CPA  $EC_{50}$ -ét csökkentette szignifikánsan, amely hatás az ADA gátlás következményének értékelhető. Feltételezzük, hogy ha a DCF kevésbé szelektívnek bizonyult volna, és az EHNA-hoz hasonló mértékben gyengítette volna a pitvarokat, mérsékelt  $EC_{50}$  csökkentő hatását nem tudtuk volna detektálni.

A jelen disszertáció első vizsgálatában tehát kimutattuk, hogy az ADA és PDE2 gátló EHNA erőteljesebben növelte a szelektív  $A_1$  receptor agonista CPA maximális inotróp hatását hyperthyreoid tengerimalac pitvaron, mint a szelektív ADA inhibitor DCF, ami megerősítette a munkacsoport azon korábbi eredményét, hogy hyperthyreosisban a PDE2 gátlás növeli a CPA hatását (Gesztelyi és mtsai, 2003b). A DCF ugyanakkor kismértékben, de statisztikailag szignifikánsan csökkentette a CPA  $EC_{50}$  értékét hyperthyreoid tengerimalac pitvaron. Mivel a CPA nem szubsztátja az ADA-nak (Pavan és IJerman, 1998), a CPA-ra adott válasz növekedése nem írható egy ADA gátlás miatti csökkent CPA bomlás számlájára. Eredményeink arra utalnak, hogy az ADA gátlása fokozza a hyperthyreoid  $A_1$  receptor és/vagy a posztreceptorális jelátvitel hatékonyságát, amivel közelíti azt az euthyreoid szinthez. A jelenség hátterében felvethető az intracelluláris adenzin koncentráció növekedése, ugyanakkor valószínűsíthető az extracelluláris adenzin-szint emelkedésének szerepe.

Az ADA gátlása tehát azon túl, hogy növeli az igazoltan kardioprotektív adenzin mennyiségét, erősíteni látszik a hyperthyreoid  $A_1$  receptor eredendően gyengült működését a myocardiumban. Ennek jelentősége abban rejlik, hogy ráirányítja a figyelmet az ADA gátlók kardioprotektív célú alkalmazásának lehetőségére olyan esetekben, amelyekben látens vagy manifeszt hyperthyreoid állapotú szívek ischaemiás károsodásnak vannak kitéve.

## 5.2. Az agonisták és receptoriális rendszerek tulajdonságainak befolyása az RRM megbízhatóságára

Az RRM egy nemlineáris regresszió alapuló koncentráció-becslő eljárás. Az RRM alkalmazása során egy 3 (esetleg 4) konstanst, 2 változót és 1 regressziós együtthatót tartalmazó egyenletet illesztünk egy olyan E/c görbére, amely egy állandó, figyelembe nem vett agonista koncentráció és a E/c görbe felvétele során bemért (tehát ismert és figyelembe vett) agonista koncentrációk együttes hatását mutatja. Az RRM célja a figyelembe nem vett (így a E/c görbét „torzító”) koncentráció meghatározása a figyelembe vett (teszt) koncentrációkra adott válaszok torzulása alapján. Ehhez szükség van a teszt agonista koncentrációja és az általa az adott rendszerben kiváltott hatás közötti kapcsolatot leíró paraméterek ismeretére (a Hill modell esetén:  $E_{max}$ ,  $EC_{50}$ ,  $n$ ). Elvi különbség van azon két eset között, amikor a torzító és a teszt koncentrációk ugyanazon agonistához tartoznak, illetve amikor nem (Gesztelyi és mtsai, 2004; Karsai és mtsai, 2006).

A munkacsoport korábbi, biológiai mintán szerzett tapasztalatai alapján a torzító és a teszt agonista különbözősége nem szükségszerűen képezi az RRM gyakorlati hasznosíthatóságának gátját. Egy korábbi vizsgálatban a muszkarin agonista metakolint (mint torzító agonistát) nagy pontossággal sikerült meghatározni  $A_1$  receptor agonista CPA (mint teszt agonista) segítségével (Gesztelyi és mtsai, 2004). Általánosságban azonban továbbra is létjogosultsága volt azon elméleti aggálynak, miszerint a torzító és a teszt agonista eltérő tulajdonságai megghamisíthatják az RRM eredményét. Ennek megfelelően a jelen

disszertációt megalapozó második vizsgálatunk fő célja az RRM segítségével kapható becslések megbízhatóságának megállapítása volt eltérő tulajdonságú torzító és a teszt agonisták esetén. Emellett vizsgáltuk a torzító koncentráció ( $c_{bias}$ ) nagyságának, valamint az agonisták hatását mediáló rendszer tulajdonságainak ( $n_{op}$ ) a befolyását is.

Az RRM megbízhatóságát komputerrel szimulált rendszerben vizsgáltuk. Az agonisták és a receptor tulajdonságait az agonizmus operatív modellje alapján definiáltuk, amely általános (mechanizmusfüggetlen), megkülönbözteti az affinitást és a hatékonyságot (efficacy) mint az agonista-receptor interakció két jellemzőjét (Black és Leff, 1983; Giraldo és mtsai, 2002; Kenakin, 2004), valamint van olyan kiterjesztése, amely modellezi két különböző agonista szimultán hatását egyféle receptoron (Leff és mtsai, 1993). Meg kell említenünk, hogy az operatív modellt az utóbbi időben kritika érte, mivel a modellt megalapozó reakcióegyenlet (2.7. egyenlet) fiziko-kémiailag nem olyan pontos, mint a del Castillo-Katz séma (2.11. egyenlet), illetve ennek (még kevesebb elhanyagolást tartalmazó) továbbfejlesztett változatai (Colquhoun, 1998; Bindslev, 2008). A jelen vizsgálatban azonban az affinitást mint az agonista-receptor komplex egyensúlyi disszociációs konstansát definiáltuk („mikroszkópos affinitás”), a  $\tau$ -t pedig mint az agonista-receptor komplex kialakulása utáni összes esemény jellemzőjét (a hatás kialakulásáig), ily módon kikerültük az operatív modellben rejlő hibalehetőséget (ld.: 2.5.5. alfejezet).

A jelen értekezés második vizsgálatának három szakasza közül az elsőben a  $c_{bias}$  és az  $n_{op}$  hatását tanulmányoztuk az RRM pontosságára. A farmakológus szakmában nem egységes az  $n_{op}$  megítélése. Egyes receptor modellek azért nem tartalmazzak az  $n_{op}$ -hoz hasonló meredekségi tényezőt (Giraldo és mtsai, 2002), mivel kifejlesztőik az  $n_{op}$  fiziko-kémiai értelmezését problematikusnak tartják (Bindslev, 2008). Ennek ellenére mi fontosnak tartottuk az  $n_{op}$  szerepeltetését és vizsgálatát, az  $n_{op}$  ugyanis, mint a receptorális rendszer jellemzője, látványosan befolyásolja a  $E/c$  görbék alakját (4. ábra), a célunk pedig az volt, hogy az RRM-et a lehető legváltozatosabb körülmények között teszteljük. A receptor koncentráció ( $[R_0]$ ) változása visszavezethető a  $\tau$  ( $[R_0]/K_E$ ) változására, ezért elegendőnek tartottuk, hogy utóbbi hatását csak a  $K_E$  változtatásával vizsgáljuk. Az  $[R_0]$  jelentőségét a szimuláció szempontjából tovább csökkent, hogy nem befolyásolja a torzító és a teszt agonista  $\tau$  arányát ( $\tau_{bias}/\tau_{test}$ ), a  $K_E$  viszont igen. Az  $E_{max}$ -ot

meghatározó  $E_m$  is egyformán érinti a torzító és a teszt agonista hatását, tehát változtatásának nem lett volna jelentősége a mi szempontunkból. Az egyszerűség kedvéért az első szakaszban a torzító és a teszt agonistát azonosnak vettük (5. ábra).

Az első szakasz során a  $c_x$  értékek figyelemreméltó pontossággal becsülték meg a  $c_{bias}$ -t mindhárom rendszerben ( $n_{op} = 0.5; 1; 1.5$ ) az agonista saját (torzítatlan, egyagonistás) E/c görbéjének kb.  $EC_{25}$  és  $EC_{75}$  értékei között. Ezen az intervallumon kívül a becslési pontosság csak  $n_{op} = 1$  mellett volt jó, 1-nél nagyobb vagy kisebb  $n_{op}$  esetén látványosan romlott, különösen nagy  $c_{bias}$  és egyidejű kis  $n_{op}$  esetében (6. ábra). Vagyis, az  $n_{op}$  által megjelenített rendszer-tulajdonság befolyásolja ugyan az RRM megbízhatóságát, de csak marginális koncentrációknál (amelyek túl kicsi vagy túl nagy hatást váltanak ki).

A jelen értekezés második vizsgálatának második szakaszában a torzító és a teszt agonista egymásétól eltérő affinitásának és (kötődés utáni) hatáskiváltó képességének hatását vizsgáltuk meg az RRM becsléseire. Az A-tól I-ig jelölt torzító agonistákat az A jelzésű teszt agonistával határoztuk meg három rendszerben ( $n_{op} = 0.5; 1; 1.5$ ). A könnyű összehasonlíthatóság érdekében  $c_{bias}$ -nak a torzító agonisták saját E/c görbéinek ugyanazon pontjait vettük minden esetben ( $EC_{25}$ ,  $EC_{50}$ ,  $EC_{75}$ ) (7. ábra).

Az azonos  $\tau$ -jú (azonos agonistacsoportba tartozó) agonisták identikus  $c_{bias}$  értékeihez ugyanabban a rendszerben ugyanazt a  $c_x$ -et kaptuk, tehát a torzító és a teszt agonista eltérő affinitása nem befolyásolta az RRM-et. Az RRM affinitással szembeni közömbössége arra vezethető vissza, hogy a 3.4. egyenlet a Gaddum egyenlet módosított formája (Leff és mtsai, 1993). A Gaddum egyenlet az agonista koncentrációján túl egy antagonistá koncentrációját tartalmazza, amely el van osztva az antagonistá affinitását jellemző  $K$  értékkel. A 3.4. egyenletben a Gaddum modell antagonistáját a torzító agonista helyettesíti. A keresett  $c_{bias}$  értékek ( $EC_{25}$ ,  $EC_{50}$  és  $EC_{75}$ ) egyenesen arányosak a  $K_{bias}$  értékével, ezért a  $c_{bias}$  elosztása a megfelelő  $K_{bias}$ -szel egy olyan mennyiséget eredményez, ami független az affinitástól. Egy agonistacsoporton belül a közös  $c_x$ -et becslésekké konvertálva azok úgy aránylottak egymáshoz, mint az egyes agonistákhoz tartozó  $K_{bias}$  értékek (mivel azokat felhasználtuk a becslések  $c_x$ -ből való kiszámolásához). Ennek

megfelelően egy agonistacsoporton belül a becslések százalékos eltérése a megfelelő  $c_{bias}$ -tól ugyanúgy közös értéket vett fel, mint a  $c_x$  (8. ábra).

Az A, B, C agonistacsoportban ( $\tau_{bias}/\tau_{test} = 1$ ) és az E, G, I csoportban ( $\tau_{bias}/\tau_{test} = 10$ ) a  $c_{bias}$  értékek meghatározása mindhárom rendszerben hasonló pontosságú volt, mint a torzító és a teszt agonista azonossága esetén (8. ábra). A D, F, H rendszerben ( $\tau_{bias}/\tau_{test} = 0.1$ ) azonban az RRM becslései lényegesen rosszabbak voltak, mint az A, B, C csoport esetében:  $n_{op} = 0.5$  mellett a becslés még viszonylag pontos volt, nagyobb  $n_{op}$  mellett viszont elfogadhatatlanná vált. Mi több, a nagyobb  $n_{op}$  és nagyobb  $c_{bias}$  együtt olyan nagy  $c_x$  értékeket eredményezett, amelyekből már nem lehetett becslést számolni (8. ábra). A  $c_{bias}$ -on és az  $n_{op}$ -on túl tehát az agonisták  $\tau$  értéke is befolyásolja az RRM becslési pontosságát.

A  $\tau_{bias}/\tau_{test}$  arány és az  $n_{op}$  hatása nem volt független egymástól: kisebb  $\tau_{bias}/\tau_{test}$  arányhoz kisebb  $n_{op}$ , nagyobb  $\tau_{bias}/\tau_{test}$  arányhoz pedig nagyobb  $n_{op}$  volt szükséges a 3.8. egyenlet jó illeszkedéséhez és a becslés elfogadható pontosságához (8. ábra). Ez alapján az illesztett 3.8. egyenlet lefutásából következtetés vonható le a  $\tau_{bias}/\tau_{test}$  arány és az  $n_{op}$  tekintetében. Az „alatta majd felette” típusú lefutás  $\tau_{bias}/\tau_{test} > 1$  arányra és/vagy  $n_{op} < 1$  operatív meredekségre utal, míg a „felette majd alatta” jelleg  $\tau_{bias}/\tau_{test} < 1$  aránnyal és/vagy  $n_{op} > 1$  értékkel társul (7. ábra). Ez, amennyiben az operatív modell ebből a szempontból is jól jellemzi a receptorműködést, fontos jelzője lehet az RRM-mel kapott eredmények megbízhatóságának: a viszonylag jó illetve a nem túl szélsőségesen „alatta majd felette” típusú illeszkedés elfogadható becslési pontosságot sugall, míg a szembeütnően „felette majd alatta” jellegű görbelefutás elfogadhatatlanul pontatlan becslés veszélyére hívja fel a figyelmet (3. táblázat).

A második szakaszban kapott eredmények alapján tehát kijelenthető, hogy a legtöbb esetben az RRM elfogadhatóan pontos becslést képes adni a  $c_{bias}$ -ról akkor is, ha a torzító és a teszt agonista eltérő affinitással illetve kötődés utáni hatáskiváltó képességgel rendelkezik (a két agonistáról a jelen vizsgálatban feltételeztük, hogy ugyanahhoz a receptorhoz kötődnek). Fontos ugyanakkor, hogy, ha már az RRM nem is szolgáltat minden esetben elfogadhatóan pontos becslést, az RRM egyenletének lefutásából (a E/c görbe adatpontjaihoz képesti helyzetéből) következtetni lehet a becslések megbízhatóságára (3. táblázat),

továbbá arra, hogyan lehet megbízhatóbb eredményhez jutni (ld.: 75. oldal, első bekezdés).

| Az RRM illesztett egyenletének lefutása                                         | $\tau_{bias}/\tau_{test}$ | $n_{op}$ | A becslések pontossága       |
|---------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|----------|------------------------------|
| „alatta majd fölötte”                                                           | >1                        | <1       | viszonylag pontos            |
| viszonylag jó illeszkedés, „alatta majd fölötte” jelleg nagyobb $c_{bias}$ -nál | >1                        | 1        | pontos                       |
|                                                                                 | 1                         | <1       |                              |
| tökéletes illeszkedés                                                           | >1                        | >1       | pontos                       |
|                                                                                 | 1                         | 1        |                              |
| viszonylag jó illeszkedés, „fölötte majd alatta” jelleg nagyobb $c_{bias}$ -nál | 1                         | >1       | kis vagy közepes fölébecslés |
|                                                                                 | <1                        | <1       |                              |
| „fölötte majd alatta”                                                           | <1                        | $\geq 1$ | durva fölébecslés            |

**3. táblázat.** Az RRM E/c adatpontokra illesztett egyenletének (3.8. vagy 3.9. egyenlet) lefutása és az RRM által szolgáltatott koncentráció-becslések pontossága közötti kapcsolat.  $\tau_{bias}$  - a torzító agonista operatív hatékonysága;  $\tau_{test}$  - a teszt agonista operatív hatékonysága;  $n_{op}$  - az operatív meredekségi tényező;  $c_{bias}$  - a torzító koncentráció (amelynek meghatározása az RRM célja).

Az  $n_{op}$  jelentős hatása az RRM becslési pontosságára felvetette annak lehetőségét, hogy az RRM szimmetrikus függvényt definiáló egyenlete nem tud megfelelően illeszkedni aszimmetrikus E/c görbékre (vagyis olyanokra, amelyeknél az  $n_{op} \neq 1$ ). Az RRM addig használt egyenletében (3.8. egyenlet) ugyanis a Hill egyenlet szerepelt receptorműködési modellként, a Hill egyenlet pedig mindig szimmetrikus függvényt definiál (Giraldo és mtsai, 2002). A jelen értekezés második vizsgálatának harmadik szakaszában ezért – szélesebb  $\tau$  tartományt felölelve, de egy értéken rögzített affinitással – megismételtük a második szakasz *in silico* kísérleteit. Az  $n_{op}$  felső értékét is megemeltük (1.5-ről 2-re), hogy fokozzuk az operatív meredekség hatását a koncentráció-meghatározásra. Az RRM kivitelezéséhez ugyanakkor szerkesztettünk egy olyan egyenletet, amely a Hill egyenlet helyett a Richards egyenletet tartalmazta receptorműködési modellként,

amely aszimmetrikus függvényt is elő tud állítani (Giraldo és mtsai, 2002). A kérdéses 3.9. egyenletben, a 3.8. egyenlettel szemben, eggyel több mennyiség szerepelt: egy szimmetria tényező, amely a teszt agonista adott rendszerben felvett torzítatlan, egyagonistás E/c görbéjének szimmetriáját (illetve aszimmetriáját) jellemezte. A koncentráció-meghatározást mindkét egyenlettel elvégeztük és összehasonlítottuk a kapott becslések pontosságát. Amennyiben az aszimmetria volt az oka a 3.8. egyenlettel kapott rosszabb becsléseknek  $n_{op} \neq 1$  mellett, azt várhattuk volna, hogy a 3.9. egyenlettel végzett becslés  $n_{op} \neq 1$  esetén lényegesen pontosabb lesz.

A harmadik szakasz eredményei szerint azonban a E/c görbe aszimmetria figyelembevétele az RRM alkalmazása során nem hozott átütő javulást a becslési pontosság terén, emellett lényegében nem befolyásolta azokat a hibákat sem, amelyek néhány esetben lehetetlenné tették becslések meghatározását (2. táblázat). Ez azt jelenti, hogy nincs okunk lecserélni az RRM eddig használt egyenletét (3.8. egyenlet) egy bonyolultabbra csak azért, hogy alkalmazkodjunk a E/c görbék (általában nem túl nagyfokú) aszimmetriájához.

Az alkalmazott széles  $\tau$  tartomány azonban felfedte az RRM egy korábban nem tapasztalt hibalehetőségét: ha  $\tau_{bias}/\tau_{test} > 1$  és az  $n_{op}$  nem elég nagy, a becslés meghiúsulhat nagy  $c_{bias}$  értékeknél. Vagyis, mennél nagyobb a  $\tau_{bias}/\tau_{test}$  arány és mennél kisebb az  $n_{op}$ , annál kisebb lesz a  $c_{bias}$  azon értéke, amely fölött az RRM már nem kivitelezhető (2. táblázat). Ez a jelenség azért lép fel, mert ha egy kis hatáskiváltó képességű teszt agonistával E/c görbét veszünk fel nagy mennyiségű nagy hatáskiváltó képességű torzító agonista jelenlétében, a teszt agonista növekvő mennyisége egyre több nagyobb hatékonyságú torzító agonistát fog leszorítani a receptorokról, ami koncentráció-függő inverz hatáshoz vezet (9. F-H ábra). A negatív hatás-tartományban futó E/c görbék az RRM számára sajnos értelmezhetetlenek (2. táblázat).

A jelen értekezés második vizsgálata alapján megállapíthatjuk, hogy az RRM megfelelően kivitelezve alkalmas lehet endogén agonisták koncentráció-változásainak meghatározására azok receptorainak mikrokörnyezetében. Az RRM sikeres alkalmazásának a 2.1. alfejezet végén (8. old.) említett hat feltételét a következő hárommal egészíthetjük ki:

1. A teszt agonista adott rendszerbeli  $E_{\max}$ -ának érdemes közel lennie a torzító agonista  $E_{\max}$ -ához, mivel ebben az esetben, ha a  $c_x$  a teszt agonista saját E/c görbéjének középső szakaszára esik, a  $c_{\text{bias}}$  is a középső szakaszra fog esni a torzító agonista saját E/c görbéjén.

2. Ha az RRM illesztett egyenlete látványosan „alatta majd fölötte” fut a torzult E/c görbe pontjainak, a koncentráció-meghatározást érdemes megismételni egy nagyobb hatáskiváltó képességű teszt agonistával. Amennyiben viszont „fölötte majd alatta” lefutást tapasztalunk, a becsléseket különösen óvatosan kell kezelni és a meghatározást ajánlott megismételni egy kisebb hatáskiváltó képességű teszt agonistával.

3. Ha a teszt agonista koncentráció-függő negatív hatást vált ki, a meghatározást egy nagyobb hatáskiváltó képességű teszt agonistával kell megismételni. (A teszt agonista hatáskiváltó képességének növelését az RRM egyenletének markáns „fölötte majd alatta” típusú lefutása korlátozza; ld. 2. pont.)

Az RRM jelentőségét jelenleg nehéz lenne megítélni. Jellegéből fakadóan (egyrészt körülményes kivitelezése miatt, másrészt mert mérési pontosságát a biológiai variabilitás is befolyásolja) nem jelent alternatívát a jelenleg használt koncentráció-meghatározó módszerekkel szemben a legtöbb helyzetben. Korábbi vizsgálataink során azonban az RRM már bizonyította alkalmasságát néhány olyan speciális helyzetben, amelyben a jelenleg elfogadott koncentráció-meghatározó módszereket nehéz, ha nem éppen lehetetlen alkalmazni. Az, hogy az RRM helyet kaphat-e az elismert koncentráció-meghatározó módszerek között, több tényező függvénye (pl. milyen receptorok teljesítik a módszer legfőbb követelményét, a deszenzitizáció elhanyagolható mértékét a mérés ideje alatt), melyek további vizsgálatokat igényelnek.

### 5.3. Új eredmények

1. *Ex vivo* állatkísérletes vizsgálataink során ADA gátló EHNA és DCF jelenlétében egyaránt erősödött a CPA negatív inotróp hatása hyperthyreoid tengerimalac pitvaron, miközben alig változott euthyreoid pitvaron. Mivel a CPA bomlását az ADA nem katalizálja, a jelenség hátterében a hyperthyreoid pitvari A<sub>1</sub> receptor válaszkészségének fokozódását tételezzük fel az ADA gátlás hatására.

2. *In silico* vizsgálatunk során megállapítottuk, hogy ha a torzító és a teszt agonista azonos, a torzító agonista EC<sub>25</sub> és EC<sub>75</sub> közötti koncentrációinak becslése minden vizsgált  $n_{op}$  esetén elfogadható. Amennyiben az  $n_{op} \neq 1$ , a torzító agonista  $<EC_{25}$  és  $>EC_{75}$  koncentrációinál a becslések pontatlanná válnak.

3. Ha a torzító és a teszt agonista különböző, eltérő affinitásuk nem befolyásolja az RRM pontosságát, eltérő efficacy értékük viszont igen. Ha az RRM egyenlete, amelyet a torzult E/c görbék adatpontjaira illesztettünk, kis teszt agonista koncentrációknál markánsan a E/c görbe adatpontok fölött fut, nagyobb teszt agonista koncentrációknál pedig alattuk, a becsléseket óvatosan kell kezelni és a koncentráció-meghatározást érdemes megismételni egy kisebb efficacy értékű teszt agonistával.

4. A teszt agonista kiválasztásakor a még hasznosítható efficacy-tartomány alsó határát az a jelenség jelöli ki, amikor a  $c_{bias}$  jelenlétében a teszt agonista koncentráció-függő negatív hatást vált ki. Negatív hatásokra az RRM egyenletét nem lehet illeszteni.

5. A koncentráció-hatás görbék aszimmetriájának figyelembevétele az RRM eredeti egyenletének módosításával nem javítja lényegesen az RRM becslési pontosságát és nem korrigálja az RRM jellemző hibáit sem. Emiatt nincs okunk az RRM Hill modellt tartalmazó egyenletét bonyolultabbra cserélni.

## 6. Összefoglalás

A jelen értekezés vizsgálatait során a következő kérdésekre válaszoltunk:

**1. vizsgálat:** Hogyan befolyásolja az ADA gátlása egy ADA rezisztens  $A_1$  receptor agonista hatását eu- és hyperthyreoid tengerimalac bal pitvaron?

Az ADA gátlás fokozza az ADA rezisztens  $A_1$  receptor agonista CPA kiváltotta negatív inotróp hatást hyperthyreoid tengerimalac bal pitvaron, míg ez a jelenség csak jelzésszerűen figyelhető meg euthyreoid pitvaron. A jelenség oka feltehetően a hyperthyreoid  $A_1$  receptor jelátviteli hatékonyságának növekedése, melynek létrehozásában felvethető az intracelluláris adenzin-többlet szerepe.

**2. vizsgálat - 1. szakasz:** Hogyan befolyásolja a meghatározandó  $c_{bias}$  nagysága és a rendszert jellemző  $n_{op}$  az RRM pontosságát?

A  $c_{bias}$  becslése  $n_{op} = 1$  mellett a legpontosabb, de a torzító agonista  $EC_{25}$  és  $EC_{75}$  értéke között minden vizsgált  $n_{op}$  esetén elfogadható. Ha azonban a  $c_{bias}$  nagy és az  $n_{op} < 1$ , a becslések elfogadhatatlanul pontatlanná válnak.

**2. szakasz:** Hogy befolyásolja a torzító és a teszt agonista egymástól eltérő affinitása és kötődés utáni hatáskiváltó képessége (efficacy) az RRM pontosságát?

Míg a torzító és a teszt agonista eltérő affinitása nem befolyásolja az RRM pontosságát, az eltérő hatáskiváltó képesség igen. Az RRM illesztett egyenletének lefutásából azonban következtetni lehet a becslések megbízhatóságára, továbbá arra, hogyan lehet megbízhatóbb eredményhez jutni. Ha az RRM egyenlete látványosan „alatta majd fölötte” illetve „fölötte majd alatta” lefutású a E/c görbe adatpontjaihoz képest, a becsléseket óvatosan kell kezelni és a koncentráció-meghatározást érdemes megismételni egy nagyobb illetve kisebb hatáskiváltó képességű teszt agonistával.

**3. szakasz:** Hogyan befolyásolja a E/c görbék aszimmetriájának figyelembe vétele az RRM pontosságát?

A E/c görbe aszimmetria figyelembevétele az RRM kivitelezése során a legtöbb esetben nem javítja számottevően a becslések pontosságát és nem befolyásolja lényegesen a módszer hibáit. Ez alapján nincs okunk lecserélni az RRM eddig használt egyenletét egy bonyolultabbra azért, hogy alkalmazkodjunk a E/c görbék aszimmetriájához. Feltártuk az RRM egy eddig nem tapasztalt korlátját is: ha a torzító agonista hatékonysága (efficacy) nagyobb, mint a teszt agonistáé, a koncentráció-becslés megghiúsulhat nagy  $c_{bias}$  és egyidejűleg kis  $n_{op}$  értékeknél.

## 7. Summary

During the investigations of the present PhD thesis, the following questions were addressed:

**Study1:** How does the inhibition of ADA influence the effect of an ADA-resistant  $A_1$  receptor agonist in eu- and hyperthyroid guinea pig left atria?

The ADA inhibition enhances the negative inotropic effect evoked by CPA, an ADA-resistant  $A_1$  receptor agonist, on the hyperthyroid but not euthyroid guinea pig left atrium. This is probably due to an increase in the signal amplification of the hyperthyroid  $A_1$  receptor, and this might be mediated by the surplus intracellular adenosine content.

**Study 2 - part 1:** How does the magnitude of  $c_{bias}$  (to be estimated) and  $n_{op}$  (characterizing the system) influence the accuracy of RRM?

The estimation of  $c_{bias}$  is the most accurate in the case of  $n_{op} = 1$ , but for biasing agonist doses between  $EC_{25}$  and  $EC_{75}$ , the estimation is acceptable using every investigated  $n_{op}$ . If  $c_{bias}$  is high and  $n_{op} < 1$ , estimates become wrong.

**part 2:** How does affinity and efficacy of the agonists influence the accuracy of RRM if the biasing and test agonist are different?

While difference in affinity for the biasing and test agonist does not affect the estimation accuracy of RRM, the different efficacy does. However, the running of the fitted equation of RRM provides useful information about the reliability of estimates, and about how to obtain more reliable estimates. If the fitted equation of RRM has a considerable “below then above” or “above then below” character in relation to data points of an E/c curve, the estimates should be treated with caution, furthermore it is worthwhile repeating the measurement with a test agonist having a greater or smaller efficacy, respectively.

**part 3:** How does allowance of asymmetry of E/c curves influence the accuracy of RRM?

In most cases, allowing for E/c curve asymmetry does not ameliorate substantially the accuracy of RRM, and it has no significant influence on the limitations of the method. Thus, there is no reason to exchange the simpler Hill model in RRM for a more complicated one to comply with a possible asymmetry of E/c curves. In addition, another limitation of RRM was revealed: if efficacy of the biasing agonist is greater than that of the test agonist, the estimation can fail at simultaneously high  $c_{bias}$  and small  $n_{op}$  values.

## 8. Irodalom

### 8.1. A disszertáció elkészítéséhez felhasznált irodalom

1. Arai M, Otsu K, MacLennan DH, Alpert NR, Periasamy M. Effect of thyroid hormone on the expression of mRNA encoding sarcoplasmic reticulum proteins. *Circ Res.* 1991; 69: 266-276.
2. Bagatini MD, Martins CC, Gasparetto D, Spanevello RM, Becker LV, Rosa CS, Battisti V, Bellé L, Gonçalves JF, Schetinger MR, Dos Santos RB, Oliveira LZ, Morsch VM. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in patients with ischemic heart disease. *Clin Chim Acta.* 2011; 412: 159-164.
3. Baker SP, Scammells PJ, Belardinelli L. 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.* 2000; 130: 1156-1164.
4. Belardinelli L, Shryock JC, Song Y, Wang D, Srinivas M. Ionic basis of the electrophysiological actions of adenosine on cardiomyocytes. *FASEB J.* 1995; 9: 359-365.
5. Bindslev N. Chapter 5: Complex agonism. In: *Drug-Acceptor Interactions.* 2008. (<http://journals.sfu.ca/coactionbks/index.php/Bindslev/article/view/8>.)
6. Black JW, Leff P. Operational models of pharmacological agonism. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1983; 220: 141-162.
7. Bottinelli R, Canepari M, Cappelli V, Reggiani C. Maximum speed of shortening and ATPase activity in atrial and ventricular myocardia of hyperthyroid rats. *Am J Physiol.* 1995; 269 (3 Pt 1): C785-790.
8. Bumgarner JR, Ramkumar V, Stiles GL. Altered thyroid status regulates the adipocyte A<sub>1</sub> adenosine receptor system. *Life Sci.* 1989; 44: 1705-1712.
9. Carneiro-Ramos MS, da Silva VB, Coutinho MB Jr, Battastini AM, Sarkis JJ, Barreto-Chaves ML. Thyroid hormone stimulates 5'-ecto-nucleotidase of neonatal rat ventricular myocytes. *Mol Cell Biochem.* 2004; 265: 195-201.
10. Colquhoun D. Affinity, efficacy and receptor classification: is the classical theory still useful? In: *Perspectives on Receptor Classification: Receptor*

Biochemistry and Methodology. (eds: Black JW, Jenkinson DH, P. Gerskowitch V) 1987. vol. 6. pp. 103-114. Alan R. Liss. New York.

11. Colquhoun D. Binding, gating, affinity and efficacy: The interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors. *Br J Pharmacol.* 1998; 125: 924-947.

12. Colquhoun D. The quantitative analysis of drug-receptor interactions: a short history. *Trends Pharmacol Sci.* 2006; 27: 149-157.

13. Conant AR, Jarvis SM. Nucleoside transport in guinea-pig myocardium. *Adv Exp Med Biol* 1991; 309A: 415-418.

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

15. Cornfield LJ, Hu S, Hurt SD, Sills MA. [<sup>3</sup>H]2-phenylaminoadenosine ([<sup>3</sup>H]CV 1808) labels a novel adenosine receptor in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992; 263: 552-561.

16. Del Castillo J, Katz B. Interaction at end-plate receptors between different choline derivatives. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1957; 146: 369-381.

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

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

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

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

21. Dhalla AK, Shryock JC, Shreeniwas R, Belardinelli L. Pharmacology and Therapeutic Applications of A<sub>1</sub> Adenosine Receptor Ligands. *Curr Top Med Chem* 2003; 3: 369-385.

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

23. Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.* 2001; 53: 527-552.
24. Gardner NM, Broadley KJ. Analysis of the atypical characteristics of adenosine receptors mediating negative inotropic and chronotropic responses of guinea-pig isolated atria and papillary muscles. *Br J Pharmacol.* 1999; 127: 1619-1626.
25. Gesztelyi R, Zsuga J, Bajza A, Cseppento A, Szabo JZ, Szentmiklosi AJ. Special sensitization pattern in adenosine-induced myocardial responses after thyroxine treatment. *J Pharmacol Sci.* 2003a; 91: 295-304.
26. Gesztelyi R, Zsuga J, Hajdu P, Szabo JZs, Cseppento A, Szentmiklosi AJ. Positive inotropic effect of the inhibition of cyclic GMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE2) on guinea pig left atria in eu- and hyperthyroidism. *Gen Physiol Biophys.* 2003b; 22: 501-513.
27. Gesztelyi R, Zsuga J, Juhasz B, Der P, Vecsernyes M, Szentmiklosi AJ. Concentration estimation via curve fitting: quantification of negative inotropic agents by using a simple mathematical method in guinea pig atria. *Bull Math Biol.* 2004; 66: 1439-1453.
28. Giraldo J, Vivas NM, Vila E, Badia A. Assessing the (a)symmetry of concentration-effect curves: empirical versus mechanistic models. *Pharmacol Ther.* 2002; 95: 21-45.
29. Gøtzsche LB. L-triiodothyronine acutely increases  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in the isolated, perfused rat heart. Changes in L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels and beta-receptors during short- and long-term hyper- and hypothyroidism. *Eur J Endocrinol.* 1994; 130: 171-179.
30. Gupta RC, Neumann J, Watanabe AM. Comparison of adenosine and muscarinic receptor-mediated effects on protein phosphatase inhibitor-1 activity in the heart. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993; 266: 16-22.
31. Headrick JP, Hack B, Ashton KJ. Acute adenosinergic cardioprotection in ischemic-reperfused hearts. *Am J Physiol.* 2003; 285: H1797-1818.
32. Headrick JP, Lasley RD. Adenosine receptors and reperfusion injury of the heart. *Handb Exp Pharmacol.* 2009; (193): 189-214.

33. Hutchinson SA, Scammells PJ. A<sub>1</sub>(1) adenosine receptor agonists: medicinal chemistry and therapeutic potential. *Curr Pharm Des.* 2004; 10: 2021-2039.
34. Jahnel U, Nawrath H, Ochi R. 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.* 1992; 345: 564-569.
35. Kaasik A, Minajeva A, Paju K, Eimre M, Seppet EK. Thyroid hormones differentially affect sarcoplasmic reticulum function in rat atria and ventricles. *Mol Cell Biochem.* 1997; 176: 119-126.
36. Kaasik A, Seppet EK, Ohisalo JJ. Enhanced negative inotropic effect of an A<sub>1</sub>-receptor agonist in rat left atria in hypothyroidism. *J Mol Cell Cardiol.* 1994; 26: 509-517.
37. Karsai D, Gesztelyi R, Zsuga J, Jakab A, Szendrei L, Juhasz B, Bak I, Szabo G, Lekli I, Vecsernyes M, Varga E, Szentmiklosi AJ, Tosaki A. Influence of hyperthyroidism on the effect of adenosine transport blockade assessed by a novel method in guinea pig atria. *Cell Biochem Biophys.* 2007; 47: 45-52.
38. Karsai D, Zsuga J, Juhasz B, Der P, Szentmiklosi AJ, Tosaki A, Gesztelyi R. Effect of nucleoside transport blockade on the interstitial adenosine level characterized by a novel method in guinea pig atria. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006; 47: 103-109.
39. Keller F, Giehl M, Czock D, Zellner D. PK-PD curve-fitting problems with the Hill equation? Try one of the 1-exp functions derived from Hodgkin, Douglas or Gompertz. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2002; 40: 23-29.
40. Kenakin T. Data-driven analysis in drug discovery. *J Recept Signal Transduct Res.* 2006; 26: 299-327.
41. Kenakin T. Principles: Receptor theory in pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 2004; 25: 186-192.
42. Kenakin T. Quantifying biological activity in chemical terms: A pharmacology primer to describe drug effect. *ACS Chem Biol.* 2009; 4: 249-260.
43. Kiss E, Jakab G, Kranias EG, Edes I. Thyroid hormone-induced alterations in phospholamban protein expression. Regulatory effects on sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> transport and myocardial relaxation. *Circ Res.* 1994; 75: 245-251.

44. Ko WC, Shih CM, Lai YH, Chen JH, Huang HL. Inhibitory effects of flavonoids on phosphodiesterase isozymes from guinea pig and their structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol.* 2004; 68: 2087-2094.
45. Kreuzberg U, Theissen P, Schicha H, Schroder F, Mehlhorn U, de Vivie ER, Boknik P, Neumann J, Grohe C, Herzig S. Single-channel activity and expression of atrial L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in patients with latent hyperthyroidism. *Am J Physiol.* 2000; 278: H723-730.
46. Kurachi Y, Nakajima T, Sugimoto T. On the mechanism of activation of muscarinic potassium channels by adenosine in isolated atrial cells: Involvement of GTP-binding proteins. *Pflügers Arch.* 1986; 407: 264-274.
47. Leff P, Dougall IG, Harper D. Estimation of partial agonist affinity by interaction with a full agonist: a direct operational model-fitting approach. *Br J Pharmacol.* 1993; 110: 239-244.
48. Londos C, Wolff J. Two distinct adenosine-sensitive sites on adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977; 74: 5482-5486.
49. Longabaugh JP, Didsbury J, Spiegel A, Stiles GL. Modification of the rat adipocyte  $\text{A}_1$  adenosine receptor-adenylate cyclase system during chronic exposure to an  $\text{A}_1$  adenosine receptor agonist: alterations in the quantity of  $\text{G}_s$   $\alpha$  and  $\text{G}_i$   $\alpha$  are not associated with changes in their mRNAs. *Mol Pharmacol.* 1989; 36: 681-688.
50. Maehle AH. A binding question: the evolution of the receptor concept. *Endeavour.* 2009; 33: 135-140.
51. Mager S, Palti Y, Binah O. Mechanism of hyperthyroidism-induced modulation of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in guinea pig ventricular myocytes. *Pflügers Arch.* 1992; 421: 425-430.
52. Manthei SA, Reiling CM, Van Wylen DG. Dual cardiac microdialysis to assess drug-induced changes in interstitial purine metabolites: adenosine deaminase inhibition versus adenosine kinase inhibition. *Cardiovasc Res.* 1998; 37: 171-178.
53. Motulsky HJ, Christopoulos A. Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting. San Diego, CA:

GraphPad Software Inc. 2003. (Corrected version:  
<http://www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf>)

54. Neubig RR, Spedding M, Kenakin T, Christopoulos A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol Rev.* 2003; 55: 597-606.

55. Neumann J, Gupta RC, Jones LR, Bodor GS., Bartel S, Krause EG, Pask HT, Schmitz W, Scholz H, Watanabe AM. Interaction of beta-adrenoceptor and adenosine receptor agonists on phosphorylation. Identification of target proteins in mammalian ventricles. *J Mol Cell Cardiol.* 1995; 27: 1655-1667.

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

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

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

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

60. Peart JN, Headrick JP. Adenosinergic cardioprotection: multiple receptors, multiple pathways. *Pharmacol Ther* 2007; 114: 208-221.

61. Podzuweit T, Nennstiel P, Muller A. Isozyme selective inhibition of cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases by erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine. *Cell Signal.* 1995; 7: 733-738.

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

63. Rang HP. The receptor concept: pharmacology's big idea. *Br J Pharmacol.* 2006;147 (Suppl 1): S9-16.

64. Richards FJ. A flexible growth function for empirical use. *J Exp Bot.* 1959; 10: 290-300.

65. Rubinstein I, Binah O. Thyroid hormone modulates membrane currents in guinea-pig ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1989; 340: 705-711.
66. Ruffolo RR Jr. Review important concepts of receptor theory. *J Auton Pharmacol.* 1982; 2: 277-295.
67. Sandhu GS, Burrier AC, Janero DR. Adenosine deaminase inhibitors attenuate ischemic injury and preserve energy balance in isolated guinea pig heart. *Am J Physiol.* 1993; 265: H1249-1256.
68. Schutz W, Schrader J, Gerlach E. Different sites of adenosine formation in the heart. *Am J Physiol.* 1981; 240: H963-970.
69. Seppet EK, Kaasik A, Minajeva A, Paju K, Ohisalo JJ, Vetter R, Braun U. Mechanism of thyroid hormone control over sensitivity and maximal contractile responsiveness to beta-adrenergic agonists in atria. *Mol Cell Biochem.* 1998; 184: 419-426.
70. Seppet EK, Kolar F, Dixon IM, Hata T, Dhalla NS. Regulation of cardiac sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> channels and Ca<sup>2+</sup> transporters by thyroid hormone. *Mol Cell Biochem.* 1993; 129: 145-159.
71. Shenoy R, Klein I, Ojamaa K. Differential regulation of SR calcium transporters by thyroid hormone in rat atria and ventricles. *Am J Physiol.* 2001; 281: H1690-1696.
72. Shryock JC, Belardinelli L. Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am J Cardiol.* 1997; 79: 2-10.
73. Silva PH, Dillon D, Van Wylen DG. Adenosine deaminase inhibition augments interstitial adenosine but does not attenuate myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 1995; 29: 616-623.
74. Smolenski RT, Yacoub MH, Seymour AM. Hyperthyroidism increases adenosine transport and metabolism in the rat heart. *Mol Cell Biochem.* 1995; 143: 143-149.
75. Sommerschild HT, Kirkebøen KA. Adenosine and cardioprotection during ischaemia and reperfusion – an overview. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2000; 44: 1038-1055.

76. Souza LF, Horn AP, Gelain DP, Jardim FR, Lenz G, Bernard EA. Extracellular inosine modulates ERK 1/2 and p38 phosphorylation in cultured Sertoli cells: possible participation in TNF-alpha modulation of ERK 1/2. *Life Sci.* 2005; 77: 3117-3126.
77. Szabó Z, Lengyel I, Papp L, Juhász-Nagy A. Inosine increases anoxic tolerance and postischaemic restitution of the heart: experimental studies on possible mechanism(s) of action. *Acta Chir Hung.* 1986; 27: 259-269.
78. Szentmiklosi AJ, Cseppento A, Szabo JZ, Nosztray K, Szegi J. Myocardial and vascular actions of purinoceptor activators are reduced after thyroxine treatment. *Pharmacol Res.* 1992; 25(Suppl 2): 171-172.
79. Szentmiklosi AJ, Nemeth M, Cseppento A, Szegi J, Papp JG, Szekeres L. Potentiation of the myocardial actions of adenosine in the presence of coformycin, a specific inhibitor of adenosine deaminase. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1982; 256: 236-252.
80. Terasaka T, Nakanishi I, Nakamura K, Eikyu Y, Kinoshita T, Nishio N, Sato A, Kuno M, Seki N, Sakane K. Structure-based de novo design of non-nucleoside adenosine deaminase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2003; 13: 1115-1118. Erratum in *Bioorg Med Chem Lett.* 2003; 13: 4147.
81. Takacs IE, Szabo J, Nosztray K, Szentmiklosi AJ, Cseppento A, Szegi J. Alterations of contractility and sarcoplasmic reticulum function of rat heart in experimental hypo- and hyperthyroidism. *Gen Physiol Biophys.* 1985; 4: 271-278.
82. Tesmer JJ, Dessauer CW, Sunahara RK, Murray LD, Johnson RA, Gilman AG, Sprang SR. Molecular basis for P-site inhibition of adenylyl cyclase. *Biochemistry.* 2000; 39 : 14464-14471.
83. Van Der Graaf PH, Schoemaker RC. Analysis of asymmetry of agonist concentration-effect curves. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 1999; 41: 107-115.
84. Van der Graaf PH, Stam WB. Analysis of receptor inactivation experiments with the operational model of agonism yields correlated estimates of agonist affinity and efficacy. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 1999; 41: 117-125.
85. Weiss JN. The Hill equation revisited: uses and misuses. *FASEB J.* 1997; 11: 835-841.

## 8.2. A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Kemeny-Beke A, Jakab A, Zsuga J, Vecsernyes M, Karsai D, Pasztor F, **Grenczer M**, Szentmiklosi AJ, Berta A, Gesztelyi R. Adenosine deaminase inhibition enhances the inotropic response mediated by A<sub>1</sub> adenosine receptor in hyperthyroid guinea pig atrium. *Pharmacol Res.* 2007; 56: 124-131. (IF: **1.895**)

**Grenczer M**, Pinter A, Zsuga J, Kemeny-Beke A, Juhasz B, Szodoray P, Tosaki A, Gesztelyi R. The influence of affinity, efficacy, and slope factor on the estimates obtained by the receptorial responsiveness method (RRM): a computer simulation study. *Can J Physiol Pharmacol.* 2010; 88: 1061-1073. (IF: **1.341**)

**Grenczer M**, Zsuga J, Majoros L, Pinter A, Kemeny-Beke A, Juhasz B, Tosaki A, Gesztelyi R. Effect of asymmetry of concentration-response curves on the results obtained by the receptorial responsiveness method (RRM): an *in silico* study. *Can J Physiol Pharmacol.* 2010; 88: 1074-1083. (IF: **1.341**)

### 8.3. A PhD értekezés témájához kapcsolódó poszterek és absztraktok

Gesztelyi R, Zsuga J, **Grenczer M**, Jakab A, Szabó G, Juhász B, Lekli I, Vecsernyés M, Tósaki Á. Az adenosin dezamináz pentostatin általi gátlása növeli az M<sub>2</sub> muszkarin receptorok ingerlésével kiváltható negatív inotróp választ tiroxinkezelt tengerimalacok bal pitvarán. MÉT LXXI. Vándorgyűlése, Pécs 2007, p. 161.

Gesztelyi R, Juhász B, Zsuga J, **Grenczer M**, Jakab A, Vecsernyés M, Tósaki Á. A tiroxinkezelés hatása az A<sub>1</sub> adenosin receptorok 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (CPX) általi gátlhatóságára tengerimalac bal pitvaron. MÉT LXXII. Vándorgyűlése, Debrecen 2008, p. 202.

Gesztelyi R, Hegedüs B, **Grenczer M**, Zsuga J, Kemény-Beke Á, Varga B, Juhász B, Tósaki Á. Három A<sub>1</sub> adenosin receptor agonista (NECA, CPA, CHA) receptor rezervjének meghatározása a negatív inotróp hatásra nézve izolált tengerimalac bal pitvaron. MÉT LXXIII. Vándorgyűlése, Budapest 2009, C/30.

Gesztelyi R, Zsuga J, Hegedüs B, **Grenczer M**, Varga B, Juhász B, Kemény-Beke Á, Szentmiklósi AJ, Tósaki Á. Az olajmentes meggy-mag-kivonat hatása az acetilkolin és az adenosin-trifoszfát kiváltotta endothel-függő relaxációra izolált tengerimalac truncus pulmonalis-on. MÉT LXXIV. Vándorgyűlése, Szeged 2010, P70.

## 9. Tárgyszavak

**Magyar tárgyszavak:** adenzin, A<sub>1</sub> adenzin receptor, adenzin dezamináz, tiroxin, tengerimalac, receptoriális válaszkésztség módszer; operatív modell; affinitás; hatékonyság; meredekség; aszimmetria; számítógépes szimuláció

**Angol tárgyszavak:** adenosine, A<sub>1</sub> adenosine receptor, adenosine deaminase, thyroxine, guinea pig, receptorial responsiveness method; operational model; affinity; efficacy; slope; asymmetry; computer simulation

## 10. Köszönetnyilvánítás

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

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

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

A munka anyagi háttérét a következő pályázatok biztosították: ETT 202/2003; OTKA-PD 78223; OTKA-K 72315; TÁMOP 4.2.2-08/1-2008-0007; és TÁMOP 4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007.

## **11. Függelék**