

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Adenozin receptorok szerepe a légúti simaizom és a mononukleáris sejtek funkcionális válaszaiban

Dr. Brugós László

Témavezető:

Dr. Szentmiklósi József András



**DEBRECENI EGYETEM
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK
DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2013**

**Adenozin receptorok szerepe a légúti simaizom és a
mononukleáris sejtek funkcionális válaszaiban**

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

Írta: Dr. Brugós László

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti tudományok doktori iskolája
(farmakológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Szentmiklósi József András, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Tószaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Dr. Pórszász Róbert, PhD
Dr. Bártfai Zoltán, PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2013. szeptember 6.

Az értekezés bírálói:

Dr. Takács E. Ildikó, PhD
Dr. Vizi Éva, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. Tószaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Dr. Pórszász Róbert, PhD
Dr. Bártfai Zoltán, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2013. szeptember 6.

1. BEVEZETÉS

A kísérletes gyógyszerfejlesztés során az egyik legfontosabb tényező az a folyamat, amikor egy adott betegség gyógyításához újabb és újabb molekuláris célpontokra ható vegyületeket állítanak elő. Az utóbbi évtizedekben ilyen target – többek között – az adenosin receptor, amely gyakorlatilag minden sejtféleségben megtalálható, tehát a legkülönbözőbb sejtszintű zavarok esetén hatékony lehet a receptor aktiváció módosítása. Csaknem egy évszázada annak, hogy Drury és Szent-Györgyi (1929) megalkották azt az alapvető művet, amelyben az adenosin kardiovaszkuláris hatásait írták le alapos részletességgel, és amely komoly mérföldkő volt az adenosin receptorkutatás történetében. Ezt követően – jó néhány évtizeddel később – újabb teóriák jelentek meg, mint pl. Robert Berne (1963) a koronáriakeringés reguláció – adenosin teóriáján alapuló – metabolikus elmélete, valamint nem sokkal később Geoffrey Burnstocknak a purin és a purinerg receptorokra vonatkozó – mind a mai napig meghatározó jellegű – elmélete (Burnstock, 1976). A kardiovaszkuláris adenosin receptor regulációra vonatkozó elméleteket ezt követően egy erős respiratórikus vonal követte, élén Barnes és munkatársaival (1998). Egyre több bizonyíték halmozódott fel, hogy a tüdőben lévő sejtes elemek (epitélium, bronchiális simaizom, mononukleáris sejtek) működésében az adenosin receptor mechanizmusoknak döntő jelentőségük van. Megállapították, hogy ezen receptorok állapotának befolyásolása komoly farmakológiai jelentőséggel bírhat az asthma bronchiale és a COPD gyógyszeres terápiájában. Jelenleg az adenosinra és az adenosin receptorokra vonatkozó publikációk száma több mint 210.000. Meg kívánom jegyezni, hogy ebből mintegy 25.000 közlemény foglalkozik az adenosin kardiovaszkuláris és 4.700 közlemény az adenosinnak a légzőrendszerre kifejtett hatásaival. Ezek az adatok már számszerűen jelzik ezen fontos purin nukleozid élettani, kórélettani, farmakológiai és klinikai jelentőségét. Kétségtelen, hogy az adenosin receptorok bármiféle funkcionális vagy morfológiai károsodása komoly problémákat okozhat az illető szerv vagy szervrendszer működésében. A gyógyszerkutatás előtt óriási perspektívák állnak, hogy ezt a farmakológiai célpontot kellőképpen kihasználva újabb – adenosin receptor mechanizmusokon alapuló – vegyületeket állítsanak elő akár a kardiovaszkuláris, akár a respiratórikus alapokon nyugvó kórképek gyógyítására. Ha csak a kardiovaszkuláris vonalra koncentrálunk, akkor megállapítható, hogy jelenleg több mint 70 – adenosinerg vegyülettel kapcsolatos – klinikai tanulmány fejeződött be vagy folyamatban van (pl. AMISTAD I, AMISTAD II, ADVICE, ADSPECT, ADELIN, PROTECT, TEMPEST). Hasonló a helyzet az asthma bronchiale és a COPD kezelés vonatkozásában is. Itt a jelenleg futó vagy befejezett klinikai tanulmányok száma mintegy 40.

Jelen értekezésem fő célja az, hogy adatokat szolgáltatson az adenosin receptor funkciók jelentőségére, azok plaszticitására a bronchiális rendszerben, valamint a respiratórikus rendszer gyulladásában résztvevő polimorfonukleáris sejtekben.

A purin vegyületek fő fiziológiai hatásainak felismerését követően Burnstock volt az első aki az adenosin és adenin nukleotidok receptorait P_1 és P_2 purin-receptorokra osztotta fel. (Burnstock, 1980) A P_1 receptorokat az adenosin aktiválja, míg a P_2 receptorokat az ATP és ADP hozhatja működésbe. Nemrég négy adenosin receptor altípust különítettek el strukturális, funkcionális és farmakológiai szempontokból, ezeket A_1 , A_{2A} , A_{2B} és A_3 receptoroknak nevezték el. Az adenosin receptorok altípusának jellemzése több szempontot vesz figyelembe, mint például a speciális farmakológiai profilt (az agonisták és antagonisták hatékonysági sorrendje), a G-proteinhez történő kötődést, valamint az altípus-specifikus adenosin receptor aktivációjának a jelátviteli mechanizmusát. Ez a megközelítés szigorúan követi az International Union of Pharmacology (IUPHAR) követelményeit, amit a Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification ír elő. (Fredholm és mtsai, 2001) Minden egyes receptor altípust már klónozással is előállítottak emlőszállat és emberi adenosin receptorok alapján. Kémiai szempontból ezek a receptorok aszparagin kötődésű glikoproteinek, melyeknek a palmitoilációra alkalmas site-ja a terminális karboxil közelségében van (kivétel ez alól az A_{2A} receptor) (Fredholm és Jacobson, 2001). A receptorok a membránproteinek részei és megfelelnek a G proteinhez kötődő receptorok strukturájának. A nemrég elfogadott IUPHAR besorolás alapján és filogenetikai elemzés szerint az adenosin receptorok a G proteinekhez kötődő receptorok I. osztályába a „rhodopsin alosztályhoz” tartoznak. (Poulsen és Quinn, 1998)

2. CÉLKITŰZÉSEK

A pulmonális adenosin receptorok fontos szerepet játszanak a bronchiális funkciók élettani szabályozásában, de komoly szerepük van az asthma bronchiale, COPD és más főleg gyulladásos jellegű tüdőbetegség pathomechanizmusában is. Az adenosin receptorok – mint általában a G-proteinhez kötött receptorok – a receptorális szabályozásnak erősen ki vannak téve. Az asthma bronchiale és a COPD folyamataiban résztvevő mononukleáris sejtek adenosin receptorai fontos szerepet játszanak a gyulladásos folyamatok szabályozásában, tehát alapos elemzésük jogosnak tűnik.

Kísérleteinkben a következő kérdésekre kerestünk választ:

1. Milyen mértékben befolyásolja a krónikus metilxanthin kezelés az izolált légúti szövetek adenosin reaktivitását a kezelés folyamán? Mennyiben függenek a létrejött változások az epitélium jelenlététől? (asztmás folyamatban az epitélium károsodása, részben denudálása következik be!)
2. Megvizsgálni a xanthin-rezisztens, intracelluláris kötőhelyeknek a farmakológiai tulajdonságait és befolyásolhatóságát. Mindemellett célunk volt annak felderítése is, hogy az adenosin simaizom hatásában van-e szerepe a xantin-rezisztens A_3 receptorok aktivációjának.
3. Elemezni a különböző adenosin receptor altípusok szerepét a perifériás monociták IL-1 β felszabadításában.
4. Elemezni a különböző adenosin receptor altípusok aktivációjának hatását a monociták arachidonsav felszabadulására.

3. MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok és kezelésük

Kísérleteinkben 440-590 g súlyú hím tengerimalacokat használtunk fel. Az állatokat szabványos ketrecekben helyeztük el, ahol az állatok ételt (standard tengerimalac lucerna pelletet) és folyadékot *ad libitum* fogyaszthattak. A 12 órás nappali és éjszakai ciklust az állatok részére mesterségesen biztosítottuk.

Azon kísérletek esetében, ahol nem volt szükség előkezelésre, az állatoknál a szokásos gondozáson és megfigyelésen kívül más kezelést nem alkalmaztunk. A krónikus koffein kezelésnek kitett állatok esetén 2 kísérleti csoportot állítottunk be. Mindkét csoport állatait (kontroll és a koffeinnel kezelt) egymástól elkülönítve helyeztük el a ketrecekben. Az állatok ételt és folyadékot *ad libitum* fogyaszthattak. A tengerimalacokon két csoportban végeztünk előkezelést. Az állatok egyik csoportja 20 g/l szacharóz oldatot ivott *ad libitum*, a másik csoportnál a szacharóz oldat 600 mg/l koffeint tartalmazott (a szacharóz adása a koffein keserű ízének elfedésére szolgált). A feldolgozás előtt az állatokat egy 24 órás wash-out periódusnak vetettük alá, amikor csak szacharózos vizet kaptak, tehát a preparátumok nem tartalmaztak koffeint olyan mennyiségben, amely a vizsgálatokat zavarta volna. A kezelés alatt különböző időközönként folyamatosan mértük a kezelt tengerimalacok szérum koffeinszintjét.

3.2. Koffein meghatározás a szérumban

A vér koffein szintjének meghatározása HPLC módszerrel történt a Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémiai Tanszékén a következő módon: 0,5 ml szérumhoz 2 ml metanolt adtunk, majd összekeverés után 30° C-os hőmérsékleten inkubáció következett. Az így kapott mintát centrifugáltuk 100 g-vel 10 percig. Ezután a felülúszót eltávolítottuk és folyamatos nitrogénáramlás alatt szárítottuk. A száraz üledéket feloldottuk 0,5 ml metanolban és az oldatot tovább hígítottuk 0,5 ml bidesztillált vízzel. Ezt követően szűrtük és befecskendeztük a Milton Roy CM 4000 HPCL rendszerbe, ami Waters UV 440 detektorral (254 nm) volt felszerelve. A mintákat a Waters Spherisorb C-18 (ODS2) oszlopon (5 µm; 4,6mm x 250mm) kromatográfiás készüléken vizsgáltuk, melynél a mobil fázis metanol: víz 50:50 arányú elegye volt. Az áramlási sebesség 1 ml/ perc, a retenció idő 4,5 perc, a hőmérséklet 35° C volt.

3.3. A szövetek előkészítése

A tengerimalacokat Na-pentobarbitáttal (50 mg/kg i.p.) altattuk. A mellkas megnyitása után izoláltuk a tracheát, azt a rajta levő zsírtól, környező kötőszövettől megtisztítottuk, majd longitudinális metszéssel megnyitottuk a simaizommal (pars membranacea) ellentétes oldalon levő porcokat. Amennyiben szükséges volt, a trachea luminális felszínéről (mind a simaizom, mind a porc felett) az epitéliumot enyhe dörzsöléssel eltávolítottuk (fémrúdra applikált vattacsomóval). Az így kapott trachea preparátumokat 10 cm³ űrtartalmú, vertikális-kiképzésű szervfürdő rendszerbe (THSZ-02, Experimetria, Budapest) helyeztük. Tápoldatként Krebs oldatot használtunk (36° C), melynek összetétele a következő volt (mmol/l): NaCl 118; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; NaH₂PO₄ 1,0; MgCl₂ 1,2; NaHCO₃ 24,9 és glükóz 11,5. A tápoldatot 95%-os O₂ és 5%-os CO₂ elegyével oxigenizáltuk az ekvibrációs periódus folyamán, ezáltal az oldat pH-ja 7,4-re állt be. Minden kísérletet (amennyiben a kísérleti feltételek nem kívántak meg más kezelési módot) 10 µM dipiridamol jelenlétében hajtottuk végre a membránális purin transzport gátlása céljából. Ezáltal igyekeztünk elkerülni az intracelluláris adenzin zavaró hatását. A szöveteket 10 mN-os előfeszítés mellett függesztettük fel és 90 perces előinkubációs periódust alkalmaztunk, amelynek során a kontraktilitási paraméterek stabilizálódtak. A vegyületek alkalmazása ebben az egyensúlyi állapotban történt. A tenzióváltozás mérése izometriás mechanoelektromos transzducer (SG-01 D, Experimetria, Budapest) segítségével történt.

Kísérleteink egy részét a Fernandes és mtsai (1989), Eglén és mtsai (1991), és Hay és mtsai (1992) által leírt módszerek módosításával coaxiális bioassay rendszerben végeztük. Ez a bioassay tartalmazta az ép epitéliumú vagy az epitélium-fosztott tengerimalac tracheát (donor preparátum) és az epitélium nélküli kontroll tracheát (szenzor). A donor tracheát hosszanti metszéssel átvágtuk és félig nyitott állapotban tartottuk, amelyhez egy speciális kisméretű polietilén távtartót használtunk. Ezzel a módszerrel elkerülhető volt az esetleges mechanikai súrlódás a szenzor trachea és a donor preparátum között. Mindemellett ez a módszer lehetővé tette a különböző anyagok intenzívebb diffúzióját a donor preparátum lumenébe.

3.4. Kísérletes protokoll

A kísérletek során a mechano-elektromos jeleket folyamatosan regisztráltuk. A koncentráció függvényében, emelkedő metakolin koncentrációkkal (0. 1- 10 μM) dózis-hatás görbét vettünk fel. Az ezt követő 40 perc alatt a szöveteket 10 percenként átmostuk, majd a preparátumokat kontraháltattuk metakolinnal (0.3 μM) és addig várahoztunk, amíg be nem állt az egyensúlyi állapot. Ebben a prekontrahált állapotban adenozin (ill. a megfelelő adenzin analógokkal) kumulatív dózis-hatás görbét vettünk fel. Mosás után a preparátumokat 50 percig inkubáltuk a megfelelő specifikus vegyületekkel, majd a szöveteket metakolinnal ismét kontrakcióba hoztuk. Ebben az állapotban ismételtén felvettük az adenzin koncentráció-hatás görbéjét. A második adenzin dózis-hatás görbe felvétele után papaverint adtunk a preparátumok tápoldatához és regisztráltuk a maximális relaxáció kialakulását. Az adenzin (ill. a vizsgált speciális analógok) effektusát a 100 μM papaverin által létrehozott maximális relaxáció %-ában fejeztük ki.

3.5. Perifériás mononukleáris sejtek (PBMC) preparálása humán vérből

Boyum metodikája szerint (1968) mononukleáris sejt szuszpenziókat (átlagosan: 88-95% limfocita, 5-12% monocita) preparáltunk egészséges önkéntesek perifériás vérmintáiból. A különböző szuszpenziók megoszlási viszonyait áramlási citometriával ellenőriztük. A mononukleáris sejtek százalékos megoszlása átlagosan a következő volt: CD3^+ : 69,4%, CD19^+ : 13,5%, CD56^+ : 9,8% ill. CD14^+ : 8,3% (Coulter EPICS XL, flow cytometer, U.S.A.).

3.6. A perifériás vér mononukleáris sejtek stimulációja

Szövettenyésztő lemezekben 5×10^5 sejtet tartalmazó szuszpenziót RPMI-1640 mediumban tenyésztettünk, amelyet kiegészítettünk alacsony LPS (lipopoliszacharid) tartalmú 10% foetalis borjú szérummal (plusz 80 $\mu\text{g/ml}$ gentamycin és 2mM glutamine) megfelelően párásított közegben 5% CO_2 jelenlétében és 37°C-on. Minden mintát triplikátumban használtunk fel. A stimulációt 50 ng/ml PMA-val és kalcium ionoforral (A23187) történő 4 órás inkubációval váltottuk ki.

3.7. Az IL-1 β felszabadulás mérése a perifériás mononukleáris sejtek stimulált szuszpenziójából

Az IL-1 β koncentrációját a sejtmentes felülúszóból határoztuk meg ELISA kit segítségével (Amersham, G.B.) és az eredményeket pg/ml-ben fejeztük ki.

3.8. A perifériás mononukleáris sejtek kezelése adenzinnal ill. altípus-szelektív adenzin analógokkal

Az adenzint és a különböző adenzin receptor altípusokra specifikus vegyületeket 15 perccel adtuk a perifériás mononukleáris sejtek szuszpenzióhoz a PMA+kalcium ionofor stimuláció előtt. Szelektív adenzin A_{2B} receptor aktivátor hiányában különböző koncentrációjú NECA-t (az A_1 és A_2 receptorok nem-specifikus agonistája) alkalmaztunk 0,3 μM koncentrációjú DPCPX (A_1 receptor antagonistája) és 0,1 μM ZM 243185 (szelektív A_{2A} receptor antagonistája) jelenlétében, amely vegyületeket 15 perccel alkalmaztunk a NECA beadása előtt. Az A_3 receptorok esetében az antagonistát (MRS 1191; 10 nM) szintén 15 perccel korábban alkalmaztuk a szelektív agonista IB-MECA applikációja előtt. A másik két agonistát, a CPA-t és a CGS 21680-at szintén 10 nM koncentrációban használtuk. Az antagonisták koncentrációit előzetes kísérletek tapasztalatai alapján határoztuk meg.

A nem stimulált minták esetében a tenyésztőoldat felülúszóját használtuk, amely az aktivált minták esetében használt koncentrációjú dimetilszulfidot (DMSO) tartalmazott (PMA és kalcium ionofor nélkül). A plasztik felületről (sejttenyésztő lemezek) spontán felszabaduló IL-1 β mennyiségét minden esetben korrekcióba vettük. Az átlagos, felületi aktivitás miatt felszabaduló IL-1 β koncentrációja 12.4 ± 2.5 pg/ml volt. Meg kell jegyeznünk, hogy az oldószerként használt DMSO nem befolyásolta szignifikáns mértékben az IL-1 β produkciót.

3.9. A sejtek életképességének vizsgálata

A különböző vegyületek beadása után, az IL-1 β felszabadulás meghatározása előtt elvégeztük az ún. tripánkék exklúziós tesztet. Csak azokat a kísérletes mintákat dolgoztunk tovább, ahol a sejtek életképessége több mint 90 % volt.

3.10. Az arachidonsav felszabadulás mérése nem-stimulált és stimulált perifériás mononukleáris sejtek szuszpenziókból

3.10.1 Arachidonsav felszabadulás nem-stimulált sejteken.

A sejteket 24 szövetkultúra edénybe osztottuk szét (GIBCO, U.S.A) (0.5×10^6 sejt/lyuk) és RPMI mediumba helyeztük (GIBCO, kiegészítve 1% foetális borjú szérummal, antibiotikumokkal és glutaminnal) 37°C-on steril 5% CO₂-ot tartalmazó közegben (ASSAB, Sweden). 0.1 μ Ci aktivitású ³H arachidonsavat (³H-AA) adtunk 0.5×10^6 sejtek 20 órán keresztül. A jelölés után a sejteket háromszor mostuk foszfát-pufferben (PBS) és ezt követően nyugalmi állapotban inkubáltuk 4 órán keresztül. Ezeket a sejteket a továbbiakban nem-stimulált kontrollnak tekintettük és ezek sejtmentes felülűsóját használtuk ³H-AA mérésekhez. Mivel a teljes radioaktivitást mértük, ezért nem volt lehetőségünk az arachidonsav és az arachidonsav metabolitok szétválasztására. A továbbiakban emiatt „arachidonsav és metabolitjai” terminus technicuszt alkalmaztunk.

3.10.2 Arachidonsav felszabadulás stimulált perifériás mononukleáris sejteken

A 20 órán keresztül ³H-AA-val inkubált sejteket 50 ng/ml of PMA és 0.5 μ M kalcium ionofór (A-23187) hozzáadásával aktiváltuk 37 °C-on 4 órán keresztül. A mintákat 10 percig (1200 rpm) centrifugáltuk és a szuszpenziót 5 ml TRITOSOL szcintillátorhoz adva, az aktivitást szcintillációs számlálóval mértük le (Packard 2200CA). ³H-AA és a metabolitjainak a mediumba történt felszabadulását a teljes radioaktivitás mérése alapján detektáltuk. Az izotóp mérések értékeit a percnkénti bomlás mértékében fejeztük ki (dpm, desintegration per minute). (Victor-Vega és mtsai, 2002)

3.10.3 A perifériás mononukleáris sejtek kezelése adenzinnal, CPA-val, CGS-21680-al és IB-MECA-val

A különböző koncentrációjú adenzint és adenzin altípus-szelektív agonistákat 15 perccel adtuk a perifériás mononukleáris sejtek szuszpenzióhoz a nem-stimuláció előtt, ill. a PMA-val és a kalcium ionoforral történő aktiválás előtt. Az adenzinnal végzett kísérletekben 10 μM EHNA (ADA gátlószer) volt jelen az inkubációs médiumban, hogy kivédjük az adenzinnak az adenzin dezamináz általi bomlását. A szelektív A_{2B} adenzin receptor stimuláció elérésére NECA-t (nem-specifikus agonista A_1 és A_2 receptorokon) használtunk 0,3 μM DPCPX (A_1 receptor gátló) és 0,1 μM ZM-243185 (A_{2A} receptor gátló) jelenlétében, amelyeket a NECA beadása előtt 15 perccel alkalmaztunk. Az A_3 receptorok esetében az antagonistát (MRS 1191; 10 nM) szintén 15 perccel korábban alkalmaztuk a szelektív agonista IB-MECA applikációja előtt. A másik két agonistát, a CPA-t és a CGS 21680-at szintén 10 nM koncentrációban használtuk. Az antagonisták koncentrációit előzetes kísérletek tapasztalatai alapján határoztuk meg.

Kísérleteink egy speciális csoportjában a tenyésztőoldatot 0,2 U/ml adenzin dezaminázzal egészítettük ki, hogy a keletkező endogén adenzin zavaró hatását kiküszöböljük.

3.11. Statisztikai értékelés

Metakolinnal történő előkontrahálás után a preparátum mechanikai aktivitásában történő agonista által kiváltott relaxációt a prekontrakció %-ában fejeztük ki. 100%-os relaxációnak a papaverinnel kiváltott maximális hatást tekintettük. A dózis-hatás görbéket, amennyiben a hatások jellege ezt lehetővé tette, a non-lineáris regressziós analízis segítségével elemeztük. Az alábbi képletet alkalmaztuk: $E = E_{\max} [A]^n / ([A]^n + [EC_{50}]^n)$, ahol az E a hatást, az $E_{\max}$ a maximális hatást, az EC_{50} (a pD_2 tízes alapú negatív logaritmus), az [A] félmaximális effektív koncentrációját, az n pedig a görbe meredekségét jelenti ("midpoint slope parameter"). A számszerű eredmények közlésekor mindig a számtani átlagot és a középérték standard hibáját adtuk meg. Az EC_{50} értékeket végig a 10 alapú negatív logaritmusuk formájában jelenítettük meg (pD_2 értékek). A kísérletes csoportok közötti többszörös összehasonlításokat Newman-Keuls *post hoc* teszttel kombinált varianciaanalízissel (ANOVA) végeztük. Az észlelt változások statisztikai szignifikanciáját a Student-féle kétmintás, ill. önkontrollós kísérletek esetén a páros t-próbával is vizsgáltuk (szignifikancia küszöb $P < 0,05$).

Az IL-1 β felszabadulásnak adenzin és az adenzin receptor agonisták általi változását a perifériás mononukleáris sejtek szuszpenzióban a bazális IL-1 β produkció százalékában fejeztük ki. A pD₂ és E_{max} meghatározásokat non-lineáris regressziós módszerrel határoztuk meg.

Az arachidonsav és metabolitja felszabadulását az adenzin és analógjai hatására a perifériás mononukleáris sejtek szuszpenzióban a bazális arachidonsav termelődés százalékában fejeztük ki. Az EC₁₅ értékeket (a bazális arachidonsav produkció 15%-os csökkenéséhez szükséges agonista koncentráció) az agonista dózis-hatás görbék alapján lineáris regressziós analízissel határoztuk meg. A kísérletes csoportok közötti többszörös összehasonlításokat Newman-Keuls *post hoc* teszttel kombinált varianciaanalízissel (ANOVA) végeztük. Az észlelt változások statisztikai szignifikanciáját a Student-féle kétmintás, ill. önkontrollos kísérletek esetén a páros t-próbával is vizsgáltuk (szignifikancia küszöb $P < 0,05$).

A szignifikancia feltétele a $P < 0,05$ volt (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1. Krónikus koffeinkezelés hatása az adenzin bronchiális hatására

A krónikus koffein kezeléssel kapcsolatos kísérleteink legfontosabb eredményeinek a következők tarthatók:

- (1) Eritélium-intakt tengerimalac trachea preparátumokon végzett kísérletek során megállapítottuk, hogy az adenzin által létrehozott relaxáció a tartós koffeinkezelés 1-2. hetében eléri maximumát, majd a 10. hétre fokozatosan csökken.
- (2) Az eritélium mechanikus eltávolítása után a fenti bifázikus hatás nem jön létre, hanem a kialakuló - adenzinnal szembeni - szenzitizáció a koffein kezelés teljes időtartama alatt fennáll.
- (3) Co-axiális bioassay rendszert használva (co-axiálisan elhelyezkedő kontroll szenzor, eritélium-fosztott trachea csíkokon, amelyet speciálisan kiképzett trachea tubus vesz körül: donor) megállapítottuk, hogy a 6 hetes koffein kezelt tengerimalacból preparált, eritélium fosztott trachea gyűrűt donorként alkalmazva a szenzor preparátumon az adenzin hatása nem módosul, ugyanakkor, ha eritélium-ép koffein kezelt tracheákat alkalmazunk, akkor az adenzin hatása csökken.

- (4) Eritélium-intakt, koffein kezelt trachea csíkokon sem a ciklo-oxigenáz gátlása (indomethacin, diclofenac), sem a lipoxigenáz bénítása (NDGA, AA861) nem befolyásolja az adenzin által létrehozott válaszokat.
- (5) Koffein kezelt állatok eritélium-ép trachea preparátumán a neuropeptidek capsaicinnel történő kiürítése után az adenzin válasz fokozódott.

Ennek alapján kimutattunk egy olyan érdekes, nem mindennapi jelenséget, hogy az adenzin antagonistá koffeinkezelés bifázikus hatást hoz létre az adenzin érzékenységben, történetesen létrehoz egy kezdeti szenzitizációt, amelyet fokozatos megszűnés követ.

A koffein széles körben fogyasztott pszichoaktív szer, mely az adenzin receptorok nem-specifikus antagonistája. A tengerimalac trachea A_2 adenzin receptorokat tartalmaz (Collis és Hourani, 1993), de Losinski és Alexander (1995) vizsgálatai alapján ezek a típusos A_2 receptorok, ugyanis az agonista hatásprofil alapján az A_{2B} csoportba, az antagonistá hatásprofil alapján az A_{2A} csoportba sorolhatók. Figyelemreméltó az a néhány kísérleti adat, amely szerint a tengerimalac tracheában xantinrezisztens adenzin receptorok is vannak. Ezek a receptorhelyek valószínűleg intracelluláris lokalizációjúak (Brown és Collis, 1982). A jelenlegi kísérleteket ezért membrán adenzin transzport gátlás mellett végeztük el annak érdekében, hogy kizárjuk az adenzinnak az intracelluláris receptorokkal történő esetleges interakcióját.

A hosszantartó koffeinkezelés hatásával kapcsolatban az adenzin receptorokon meglehetősen ellentmondásosak az irodalmi adatok. A központi idegrendszerről szóló néhány tanulmány az A_1 receptoroknak az up-regulációját figyelte meg, míg mások ezt nem tapasztalták koffeinkezelés után. Ellentmondó adatokat publikáltak az A_2 adenzin receptorok szabályozásában is krónikus koffeinkezelés alatt. Számos kísérletben nem találtak változást a koffeinkezelés során és az A_{2A} adenzin receptorok számában, ugyanakkor Johansson és mtsai (1997) leírták, hogy koffeinfogyasztás (1 g/l) emelte az adenzin receptorok számát egér agyának striátumában. Ami az A_{2B} receptorok szabályozását illeti, Fredholm (1982) nem tapasztalta, hogy 1 hetes koffeinkezelés után a központi A_{2B} receptorok számában változás állt volna be.

Viszonylag kevés irodalmi adat foglalkozik a hosszantartó koffeinkezelés hatásával a perifériás adenzin receptorokon. Varani és mtsai (1999; 2000) mutatták ki először, hogy a koffeinfogyasztás az emberi vérlemezke A_2 receptorainak az up-regulációját okozza. Zhang és Wells (1990) leírták, hogy az A_2 adenzin receptorok száma emelkedik és az A_2 receptorhatásoknak tulajdonítható biokémiai változások jönnek létre a hosszas koffeinkezelés után a patkány vérlemezkekben, de nem találtak változást a zsírsejt membránban lévő A_1 receptor indukált lipolízisben, annak ellenére, hogy szignifikáns csökkenés volt az A_1 receptorok számában. Ami a

koffeines kezelés kardiovaszkuláris következményeit illeti, 2 hetes kezelés nagymértékben potenciálta a sinus ritmus A_1 adenosin receptor indukálta szuppresszióját, míg a vazodilatációs és a reflex tachikardiás válaszok, melyek az A_2 receptor agonisták hatására jönnek létre, nem változtak.

Mind a mai napig nem áll rendelkezésre irodalmi adat arról, hogy hogyan hat a krónikus metilxantin kezelés a bronchiális rendszernek az adenosin érzékenységére. Ezen vizsgálatok jelentősége a következő szempontok miatt lehet fontos:

- (1) Az adenosin fontos szabályozó szerepet játszhat a légző rendszer fiziológias funkcióiban és az asthma bronchiale patogenézisében is fontos lehet (Fozard, 2003).
- (2) A koffein, mint adenosin receptor antagonistá gyakori fogyasztása módosíthatja a hörgőrendszernek az adenosinerg szabályozását mind egészségesekben, mind asztmás egyéneknél.
- (3) A theophyllin és származékai (amelyeknek a struktúrája és farmakológiája nagyon hasonlít a koffeinére) az asztma konvencionális terápiájában régóta alkalmazott szerek. Azt is meg kell említenünk, hogy a kísérleteinkben mért plazma koffein koncentrációk nagyságrendileg megegyeztek a rendszeres kávé és más koffeint tartalmazó italok fogyasztásával járó „terápiás” szintekkel (Fredholm és mtsai, 1999).

Kísérleteinkben a nem specifikus adenosin antagonistaként folyamatosan alkalmazott koffein epitélium-intakt trachea preparátumokon konvencionális adenosin receptor válaszfokozódást eredményezett, azonban a folyamat időbeli lezajlása szokatlan mintázatot mutatott. A kezdeti szenzitizációs periódus (3. hétig) után az adenosin által indukált mechanikai válaszok paraméterei (pD_2 és E_{max} értékek) visszatértek a kontroll értékre. Meglepő módon az epitélium-fosztott készítményeken nem tapasztaltunk ilyen kétfázisú hatást, hanem az adenosinnal szembeni szenzitizáció folyamatosan jelen volt a koffeinkezelés 10 hete alatt. A co-axiális bioassay rendszer használatával végzett kísérleteink arra mutattak, hogy az epitélium fontos szerepet játszik ebben a hatásban. Feltételezzük, hogy a folyamatos koffein kezelés során valamiféle adaptív válasz alakul ki a tracheális epitéliumban, amely ellensúlyozza a purin válaszokat. Kimutatták, hogy a tengerimalac tracheális epitélium gazdag forrása mind a bronchodilatátor (NO, PGE_2 , stb.), mind pedig a bronchoconstrictor anyagoknak (Barnes és mtsai, 1998). Ismert, hogy a légúti epitélisejtek mind a ciklo-oxigenázt, mind a lipoxigenázt expresszálnak. Azt is kimutatták, hogy a tengerimalac és a patkány tracheális epitélium granulái jelentős CGRP immunoreaktivitást mutatnak. Capsaicin kezelés a CGRP tartalmat ezekben a granulákban jelentősen csökkenti (Bertrand és mtsai, 1993).

A CGRP mellett a légúti epitéliumban endotelin-szerű immunoreaktivitást is kimutattak (Barnes és mtsai, 1998). Hay és mtsai (1997) a tengerimalac trachea epitéliumból jelentős endothelin felszabadulást is kimutattak.

Mivel kísérleteinkben sem az indomethacin és a diclofenac (ciklo-oxigenáz gátlók), sem az NDGA és az AA861 (nem-szelektív és szelektív lipoxigenáz gátlók) nem befolyásolták a koffeinkezelt tracheák adozinra adott válaszreakcióját, ezért joggal feltételezhető, hogy az adozin hatás csökkenésében sem a prosztanoidoknak, sem a leukotriéneknek nincs szerepe. Ugyanakkor az is megállapítható a kromolinnal végzett kísérleteink alapján, hogy a koffein kezelés a hízósejtek granulumaiból sem fokozza a bronchoconstrictor hatású endogén anyagok felszabadulását.

Figyelemreméltónak tartjuk azokat az eredményeinket, amelyeket a különböző típusú capsaicin kezelésekkel nyertünk. A capsaicinról kimutatott (Szolcsányi, 1996, Barthó és mtsai, 2004), hogy képes depletálni a neuropeptideket a szenzoros neuronokból, de sikerült ezt igazolni az epiteliális sejtekre is (Tschirhart és mtsai, 1990). Jelen kísérleteinkben a capsaicinnal történt előzetes in vitro kezelés (neuropeptid deplécio) fokozta az adozin hatást, míg az egyidejű in vitro capsaicin alkalmazás (egyidejű neuropeptid felszabadulás) gátolta az adozin effektusát.

Mindezek alapján feltételezzük, hogy a tartós koffeinkezelés olyan adaptogén válaszokat indít el a tracheális epitéliumban, amelyek során olyan bronchoconstrictor hatású peptidek szaporodnak fel a tracheális epitéliumban, amelyek az adozin hatására felszabadulnak, ugyanakkor az adozin bronchiális simaizom hatását jelentősen antagonizálják.

4.2. Xantin-rezisztens adozin kötőhelyek szerepének elemzése tengerimalac trachea simaizomzaton

A fejezet legfontosabb eredményeinek a következők tarthatók:

- a. A metacholinnal prekontrahált tengerimalac trachea simaizomzaton az adozin koncentráció-függő relaxációt hoz létre, amelyet a nem-specifikus A_1/A_2 adozin receptor antagonistá, 8-fenilteofillin antagonizál, de a dózis-hatás görbe eltolódása a Hill slop értékek alapján nem párhuzamos.
- b. Az intracelluláris P-site agonista 2'-dezoxiadenozin ill. adenin-9-béta-D-arabinofuranozid (ARA-A) enyhe relaxáló hatást fejt ki, de ezeket az effektusokat a metilxantin nem befolyásolja (xantin-rezisztens hatás).

- c. Az adenzin trachea relaxáló hatása jelentősen fokozható coformicin ill. EHNA (intracellulárisan ható, specifikus adenzin dezamináz gátlók) jelenlétében.
- d. Nagyon erős potenciáló hatás észlelhető, ha a 2'-dezoizadenozin hatását az intracelluláris adenzin dezamináz gátlása után vizsgáljuk. Ez a potenciáló effektus különösen a 2'-dezoizadenozin esetében kifejezett.
- e. A membránális adenzin transzportot gátló dipiridamol jelenlétében az adenzin bronchiális hatása jelentősen fokozódik, jelezve az extracelluláris receptorok kifejezett funkcionális aktivitását.
- f. Az intracelluláris P-site agonista 2'-dezoizadenozin és ARA-A mérsékelt relaxáló hatásait a membrán transzport gátlása (dipiridamol) az adenzinra kifejtett hatással ellentétben nem erősíti, hanem jelentősen antagonizálja, jelezve, hogy ezek a vegyületek nem rendelkeznek extracelluláris aktivitással.
- g. Az adenzin bronchiális hatásai mérsékelhetők voltak a specifikus A_3 adenzin receptor antagonistával, MRS 1191-el. Ez az A_3 adenzin receptorok mérsékelt szerepe mellett szól (nem xantin érzékeny receptorok!).
- h. A prekontrahált trachea simaizmon a szelektív A_3 adenzin receptor agonista IB-MECA is relaxáló hatást fejtett ki. Ez MRS 1191-el antagonizálható volt. Ezen utóbbi vegyület nem módosította a 2'-dezoizadenozin relaxáló aktivitását.

Az asthma bronchiale pathogenezisében az adenzin oki szerepe egyre inkább elfogadott (Barnes, 2003). A metilxantin típusú adenzin receptor antagonisták (teofillin, aminofillin, enprofillin, stb.) bronchodilatátor hatása ennek a hipotézisnek egyértelmű klinikai bizonyítéka.

A tengerimalac bronchiális simaizom relaxációjában egyértelműen az A_2 adenzin receptoroké a vezető szerep (Collis és Hourani, 1993). Az A_2 adenzin altípus mibenléte az intenzív kutatások ellenére sem tisztázott, ugyanis az izolált tengerimalac trachea szegmentek adenzin receptor farmakológiája nem tipikus sem az A_{2A} , sem pedig az A_{2B} receptorokra. Losinski és Alexander (1995) mutatták ki, hogy ez a szövet-típus az agonista profil alapján az A_{2B} adenzin receptort hordozó szövetek közé, míg az antagonista profil alapján az A_{2A} típusú szövetek közé sorolható. Ennek alapján feltételezik, hogy a tracheális adenzin receptorok atípusos A_2 receptorokat hordoznak, de ennek identifikálása még várat magára.

Érdekes probléma, hogy a bronchiális simaizom tartalmaz nem-xantin típusú kötőhelyeket, ill. receptorokat is, amelynek vizsgálata eléggé elhanyagolt kutatási területet képvisel. A nem-xantin

tipusú kötőhelyek, ill. receptorok részben feltételezett intracelluláris kötőhelyek (Brown és Collis, 1982; Losinski és Alexander, 1995) ill. membránális A₃ adenosin receptorok lehetnek.

Kísérleteinkben farmakológiai módszerekkel bizonyítékokat szolgáltatunk arra nézve, hogy a tradicionálisan elfogadott xantin-érzékeny receptorok mellett a tengerimalac bronchiális rendszerben vannak ún. nem-xantin típusú kötőhelyek ill. nem-xantin típusú A₃ adenosin receptorok. Az intracelluláris kötőhelyek feltételezett szerepére a gyanú akkor terelődött, amikor kimutattuk, hogy az extracelluláris adenosin receptoron ható antagonistá, a 8-fenilteofillin nem hoz létre párhuzamos elmozdulást az adenosin koncentráció-hatás görbéjében, ahogyan ez egy kompetitív antagonistá hatás esetén várható lenne. Megállapítottuk azt is, hogy a dipiridamol mint membránális adenosin transzport gátló jelentősen fokozza a bronchiális adenosin hatást, de ugyanakkor gátolja az intracelluláris P-kötőhely agonistáknak (2'-deoxiadenozin, 9-β-D-arabinofuranozil adenin) a hatását. Ebből kiindulva vizsgáltuk részletesebben az intracelluláris xantin-rezisztens kötőhelyek szerepét az adenosin bronchus simaizom hatásában.

Az elsőként felfedezett nem-xantin típusú kötőhely az adenilcikláz felszínére lokalizálódó, ún. P-site (kötőhely) (Londos és Wolff, 1977). Az intracelluláris kötőhelyek közé tartozik az S-adenozil-homociszteín-hidroláz (Zimmerman és mtsai, 1980) ill. az ún. „adenosine-binding protein” (Olsson, 1992) is, de e kötő fehérjék purin receptor farmakológiai tulajdonságai még nem eléggé kidolgozottak ahhoz, hogy befolyásolásukból érdemi és egyértelmű következtetéseket lehessen levonni élettani és patológias szerepükre vonatkozóan. Mindenesetre a P-site-ről ismert, hogy az adenilcikláz enzim része és fontos szerepet játszik számos biológiai folyamat regulációjában, mint az adenilcikláz fiziológias gátlója. Maga az adenilcikláz a közismert hidrofób, membránhoz kötött, hat transzmembrán domain-t tartalmazó egysége mellett tartalmaz egy 35-40 kDa méretű citoplazmatikus részt is (Dessauer és mtsai, 1999). Ennek a citoplazmatikus domain-nek részét képezi az ún. P-site ill. a forskolin kötőhely. Ennek a kötőhelynek a feltételezett szerepéről vannak kísérletes adataink, így pl. a pitvari miokardium elektromos és mechanikai aktivitására kifejtett adenosin hatásban szerepe lehet ezen intracelluláris elemeknek (Szentmihályi és mtsai, 1982). Marone és Casolaro (1990) komoly bizonyítékokat sorakoztattak fel amellet, hogy humán limfocitákban és polimorfonukleáris sejteken a P-site fontos szerepet játszik a sejtek cAMP anyagcseréjének szabályozásában. Ami a P-site-ra ható vegyületeket illeti, a jelenleg ismert P-site agonisták hatásereőségi sorrendben a következők: 2',5'-dideoxadenozin-3'-tetrafoszfát > 2',5'-dideoxi-3'-ATP > 2',5'-dideoxi-3'-ADP > 2',5'-dideoxi-3'-AMP > 2'-deoxi-3'-AMP > 3'-AMP > 2'-deoxiadenozin > adenosin. Farmakológiai kísérletekben e vegyületek többsége nem jut át a sejtmembránon, ezért ilyen célra csak korlátozott körülmények között alkalmazható. A

gyakorlatban a P-kötőhelyek szelektív agonistáiként az adenozint ill. az adenozin ribóz-módosított, membrán permeábilis analógjait alkalmazzák, mint pl. a 2'5'-didezoxiadenozin, 2'-dezoxiadenozin, 9-béta-D-xilofuranozil adenin, 9-béta-D-arabinofuranozil adenin (Londos és mtsai, 1980).

Jelen kísérleteinkben a xantin-rezisztens kötőhelyek fiziológiai szerepe mellett az intracelluláris adenozin dezamináz gátlása szolgáltatta a döntő bizonyítékot. Ez az enzim membránhoz asszociált (Agarwal és mtsai, 1975), az adenozint farmakológiailag kevésbé aktív inozinná bontja. Az adenozin dezamináz egyik legismertebb, szelektív gátlószere a coformycin, amelynek jelenlétében feltételezhető, hogy az adenozin (vagy adenozin dezamináz érzékeny adenozin analógok) felszaporodnak az intracelluláris térben és aktiválják az intracelluláris kötőhelyeket. Esetünkben a coformycin az adenozin hatását szignifikánsan erősítette. A P-site-on kifejtett hatás legfőbb bizonyítéka az az eredményünk volt, miszerint a specifikus P-site agonista 2'-dezoxiadenozin hatását a coformycin mintegy 50-szeresére potenciálta. Ezt az elképzelésünket tovább erősíti az a tény, hogy az EHNA mint szintén specifikus, de a coformycintől eltérő kémiai struktúrájú szer, szintén potenciálja az adenozin és a 2'-dezoxiadenozin bronchiális effektusát.

A xantin-rezisztens elemek vizsgálatára további lehetőségünk volt az extracelluláris A_3 adenozin receptorok szerepének vizsgálata. Ennek a receptornak a szerepét a tengerimalac bronchiális rendszerben, tudomásunk szerint, még nem vizsgálták. Megállapítottuk, hogy az adenozin bronchodilatátor hatását az A_3 adenozin receptor antagonistája MRS 1191 mérsékli, ugyanakkor az A_3 aktivátor IB-MECA relaxáló hatást fejt ki, amelyet az MRS 1191 szintén antagonizál.

Mindezek az eredmények farmakológiai bizonyítékokat szolgáltatnak arra nézve, hogy a jelenleg klinikai jelentőséggel bíró metilxantin-érzékeny receptorok mellett a tüdőben találhatók metilxantin rezisztens intracelluláris kötőhelyek ill. extracelluláris lokalizációjú receptorok, amelyek az A_2 adenozin receptor aktivációval megegyező hatást hoznak létre. Ennek a felismerésnek a jelentősége nemcsak elméleti jellegű, hanem esetleges innovatív következményekkel is járhatnak, hiszen a megfelelő P-site ill. A_3 adenozin receptor gátlás komoly adjuváns hatást eredményezhet egy stabil metilxantin alapú terápia mellett. Ennek megvalósítása azonban komoly előkészítést igényel, ugyanis – bár rendelkezünk hatékony A_3 adenozin receptor antagonistákkal – P-site antagonistát mind a mai napig nem sikerült előállítani.

4.3 Adenozin hatása az interleukin-1 β felszabadulásra aktivált humán perifériás mononukleáris sejteken

Ebben a témakörben nyert legfontosabb eredményeink a következők:

- a. Forbol észterrel (forbol 12-mirisztát 13-acetát) és Ca^{2+} -ionoforral (A23187) aktivált humán perifériás mononukleáris sejteken mind az adenozin, mind az altípus specifikus agonisták, CPA (A_1), CGS 21680 (A_{2A}) és IB-MECA (A_3) koncentráció-függő gátlást hoztak létre az IL-1 β felszabadulásban.
- b. Az IL-1 β felszabadulás gátlásában az agonisták hatáserősségi sorrendje a következő volt: CPA = CGS 21680 > IB-MECA > adenozin > NECA (ez utóbbi A_1 , A_{2A} és A_3 receptor gátlók jelenlétében).
- c. A CPA, CGS 21680 és az IB-MECA gátló hatása szignifikánsan antagonizálható volt DPCPX (A_1 adenozin receptor antagonista), ZM 243185 (A_{2A} receptor antagonista) vagy MRS 1191 (A_3 receptor antagonista) jelenlétében.

A jelen kísérletek elsőként igazolták az adenozin és adenozin-receptor altípusainak különböző szelektív agonistáinak közvetlen gátló hatását az IL-1 β felszabadulásban, forbol észterrel és Ca^{2+} ionoforral aktivált human monocitákon. A különböző adenozin-receptorok altípusainak részvételének tesztelésére szelektív agonistákat használtunk: CPA-t az A_1 , CGS 21680-t az A_{2A} és IB-MECA-t az A_3 receptorok stimulálására. Az A_{2B} receptorok specifikus hatásának meghatározására egy nem-specifikus A_1/A_2 receptor stimulálót a NECA-t használtuk DPCPX és ZM 243185, mint szelektív A_1 és A_{2A} receptor antagonisták jelenlétében, így ezzel A_{2B} specifikus választ váltottunk ki. A NECA esetleges A_3 hatásának kizárására, az MR 1191-t, egy szelektív A_3 receptor inhibitort használtunk. Az A_1 , A_2 és A_3 receptorokhoz köthető specifikus változásokat a receptor-specifikus szelektív antagonistákkal teszteltük.

Vizsgálatunk eredménye világosan kimutatta, hogy az adenozin az IL-1 β aktivált monocitákból történő kibocsátásának gátlását az A_1 , A_{2A} és A_3 receptorok egyaránt mediálják, míg az A_{2B} receptor hatása elhanyagolható. Az adenozin és receptor altípusainak specifikus agonistáival végzett farmakológiai dózis/válasz görbéknek az elemzése kimutatta, hogy a Hill koefficiens (n_H) különbözik az adenozin és specifikus adenozin receptorok agonistái esetében. Az adenozin receptor szelektív agonisták dózis/válasz görbéjének meredeksége nem különbözik az 1-től (egység). Másrészt az adenozin görbe meredeksége 3, ami erős pozitív korrelációt mutat a különböző

receptorok között. Az A_1 és A_3 receptorok által kiváltott IL-1 β monocitákból történő kibocsátásának gátlása adenilcikláztól független módon jön létre, míg az A_2 receptorok szerepe az adenilcikláz és PKC enzimekkel van összefüggésben (Németh és mtsai, 2003; Majumdar és Agarwal, 2003). Az A_2 receptorok által kiváltott, egyértelműen dózis dependens IL-1 β felszabadulás gátlása valószínűleg PKC-től függő foszforilációval jön létre (Palmer és Stiles, 1999). Másrészt létezik egy specifikus kölcsönhatás az adenzin és különböző proinflammációs citokinek, mint pl. az IL-1 β , receptorai között. Ezek a citokinek up-regulálhatják az A_{2A} receptorok expresszióját, legalábbis a PC12 sejteken (Trincavelli és mtsai, 2002). Az IL-1 β kibocsátásának gyenge gátlása, amit az A_{2B} receptor mediálhat, valószínűleg csak ezen receptorok alacsony adenzin affinitásának következménye.

Jelen vizsgálatban az IL-1 β -t szinte kizárólagosan a monociták termelték, amit perifériás mononucleáris sejtek szuszpenziójából (PBMC) nyertünk, melyet csak monociták és limfociták alkottak. A nem frakcionált perifériás mononucleáris sejtek szuszpenzió előnye a tisztított monocita preparátummal szemben, az előbbiben nem észlelt sejtkárosodás elmaradása (Sipka és mtsai, 2001). Ebből következik, hogy vizsgáلتainkhoz nem frakcionált, nem károsodott sejtpreparátumokat használtunk fel.

A jelen eredmények klinikai és fiziológiai fontossága, hogy az adenzinnak és receptor specifikus analógjainak gátló hatása van az IL-1 β aktivált perifériás human monocitákból történő kibocsátására. Főleg az A_{2A} receptorok szolgálhatnak potenciális anti-inflammációs targetként (Gomez és Sikovsky, 2003). Figyelemreméltó az a korábbi megfigyelésünk, hogy az egészséges önkéntesek szérumában az átlag adenzin koncentráció 100-120 nM (Sipka és mtsai, 1995) körüli, míg septicus shockban elérheti a 0,75 μ M koncentrációt is. Az adenzin koncentrációja a keringésben 4 és 10 μ M közötti is lehet szepsisben szenvedő betegeknél (Martin és mtsai, 2000). Az adenzin koncentrációja egyes gyulladásban levő szövetekben elérheti, sőt meghaladhatja a 100 μ M értéket is. (Cronstein és mtsai, 1994). Eredményeink szerint az adenzin képes gátolni az IL-1 kibocsátását aktivált monocitákból, a korábban említett koncentrációktól alacsonyabb értékeken is. Mivel az IL-1 az egyik legerősebb természetes kiváltója a hipertermiás reakciónak, az adenzin fő fiziológiai szerepe a hiperpirexia megakadályozása lehet az aktivált monociták és makrofágok IL-1 kibocsátásának a gátlásával. Mindemellett az adenzinnak lehet egy általános szerepe a gyulladásos sejtek hiperaktivitásának a moderálásában is. Az adenzin azon képessége, hogy az aktuális IL-1 szintet szabályozza a szervezet bizonyos részeiben, fontos lehet az innate immunitásban. (Haskó és Cronstein, 2004).

Összefoglalva, a jelen vizsgálat kimutatta, hogy az adenosin és szelektív adenosin receptor agonisták gátolják *in vitro*, az IL-1 β kibocsátását aktivált human perifériás monocitákból. Az a megfigyelés miszerint az A₁, A₃, és főleg az A_{2A} receptor aktivációja csökkentheti az IL-1 β kibocsátását az aktivált monocitákból további adatokat szolgáltat az endogén purin nukleozidok által kiváltott gyulladásgátló hatásamechanizmusában.

4.4. Adenosin hatása az arachidonsav felszabadulásra aktivált humán mononukleáris sejteken.

Főbb megállapításaink a következők:

- a. Forbol észterrel (forbol 12-mirisztát 13-acetát) és Ca²⁺-ionoforral (A23187) aktivált humán perifériás mononukleáris sejteken mind az adenosin, mind két altípus specifikus agonista, CPA (A₁) és CGS 21680 (A_{2A}) koncentráció-függő gátlást hozott létre az arachidonsav felszabadulásban, míg az A_{2B} és az A₃ agonisták nem fejtettek ki szignifikáns effektust.
- b. Az arachidonsav felszabadulás gátlásában az agonisták hatásereősségi sorrendje a következő volt: CGS 21681 = CPA > adenosin > NECA (ZM 24185 mint A_{2A} antagonistája és DPCPX mint A₁ adenosin receptor antagonistája jelenlétében) = IB-MECA. Az adenosin csak 100 μ M koncentráció felett fejtett ki gátlást, míg az receptor specifikus agonisták effektusa már 0,1 μ M koncentrációban észlelhető volt.

Az adenosin humán plazmaszintje 100–120 nM között van normális körülmények között (Sipka, 1995). Szeptikus shockban a betegek adenosin szintje elérheti a 750 nM-s koncentrációt (Cronstein és mtsai, 1994), míg egyes, gyulladás által érintett helyeken az adenosin helyi koncentrációja meghaladhatja a 100 μ M-s értékeket is. A jelen eredményeink alapján kimondható, hogy az adenosin 100–120 nM-os fiziológiás koncentrációja nem válthat ki szignifikáns gátló hatást az arachidonsav kibocsátására aktivált monocitákból, melyeket PKC jelátviteli transzdukciós rendszeren vagy a megnövekedett intracelluláris Ca²⁺ szint által váltottunk ki. Speciális klinikai helyzetekben azonban, amikor a gyulladásos sejtek felszaporodnak bizonyos helyeken, az adenosin magasabb koncentrációban szabadul fel, és ez csökkentheti a lokális arachidonsav kibocsátást.

Ez a gátlás, úgy tűnik, főleg az A₁ és A₂ receptorok ingerlése nyomán alakul ki, míg az A_{2B} és A₃ receptorok szerepe ebben a folyamatban elhanyagolható. Az arachidonsav aktuális szintje három intracelluláris enzim aktivitásától és együttműködésétől függ, mint: a citoszolban levő (Ca²⁺ függő) PLA₂ (cPLA₂, IV típus), a Ca²⁺ független PLA₂ (iPLA₂, IV típus) és a diacilglicerol (DAG)

lipáz (Wu és mtsai, 2004). Kiemelendő, hogy a monociták által termelt extracelluláris IL-1 a legerősebb aktivátora az arachidonsav termelésnek (Chang és mtsai, 1986), főként a cPLA₂ aktivációja miatt (Morri és mtsai, 1994). Azt gondoljuk, hogy a csökkent arachidonsavtermelés aktivált monocitákból, melyet adenozin és A₁ és A_{2A} specifikus receptor-agonisták hatására értünk el, korrelál a csökkent IL-1 termeléssel, PMA és Ca²⁺-ionofor által stimulált sejtekben (Sipka és mtsai, 2005). Bizonyos mennyiségű szekretábilis PLA₂ (II.A.typos, 14 kD) megjelenhet az aktivált thrombociták által körülvett aktivált monociták interakciójából (Krump és Borgeat, 1999), ezért nem lehet kizárni, hogy az említett enzim képes bizonyos mennyiségű extracelluláris arachidonsavat termelni. Mindazonáltal, azt hisszük, hogy ahhoz, hogy a monociták folyamatosan arachidonsavat termeljenek, környezetükben szükségük van az IL-1 folyamatos jelenlétére (Liu és Young, 2004). Lehetséges, hogy a monocitákban a cPLA₂ aktivitása közvetlenül korrelál az IL-1 intracelluláris koncentrációjával, ami az arachidonsav kibocsátását stimulálja. Az endogén adenozin egyik biológiai szerepe az lehet, hogy emelkedett koncentrációban, gátolja (főleg indirekt módon, az IL-1 termelésének gátlásával) az arachidonsav kibocsátását monocitákból az A₂ és A₁ receptorokon keresztül (Sipka és mtsai, 2005). Az A₂ receptor által mediált (cPLA₂ dependens) arachidonsav kibocsátásának gátlása magas extracelluláris adenozin szinteknél megfigyelhető még a neutrofil granulocitáknál is (Németh és mtsai, 2003). Legjobb meggyőződésünk szerint ez az első megfigyelés, miszerint az adenozin az arachidonsav termelését gátolja aktivált humán monocitákból. Ki kell emelni, hogy ez a mechanizmus valószínűleg nem működik fiziológias adenozin koncentráció esetén. Patológias körülmények között, például gyulladt szövetekben, mikor a monociták száma magas és az adenozin koncentrációja szintén, az A₁ és A_{2A} receptorok aktivációja hatékonyan gátolhatja az arachidonsav metabolitok kibocsátását monocitákból. A jelen adatok alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az adenozin erős gyulladásgátló hatását a monocitákra az IL-1 termelésének a gátlásával érheti el, ezáltal csökkentve az arachidonsav metabolitok kibocsátását is.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

Kísérleteink alapján állatkísérletes bizonyítékokat szereztünk arra vonatkozóan, hogy a tartós koffein kezelés mélyreható változásokat hoz létre a bronchiális adenozin receptorok működésében, ill. az adenozin receptorok érzékenységében. Elégge egyértelműnek látszik, hogy a hosszan tartó koffein kezelés olyan változásokat idéz elő az epiteliális sejtek szintjén, amely mélyrehatóan befolyásolja a bronchiális adenozin receptorok érzékenységét, amely az epitéliummal történő

kölcsönhatás kiiktatásával jelentős up-regulációt mutat az adenzin receptorok szintjén. Az eredményeink arra utalnak, hogy ebben a folyamatban az epiteliális sejtekben vagy azok közvetlen környezetében a neuropeptidek felszaporodásának komoly jelentősége lehet. Mivel a kávé és a koffein-tartalmú energiatalkok fogyasztása világszerte elterjedt, ezért – amennyiben az állatkísérletekben nyert adatok a humán viszonyokra is extrapolálhatók – akkor az erős kávéfogyasztó ill. energiatalfogyasztó populációban hasonló adaptív jelenségekkel számolni kell. Mivel az endogén adenzin a tüdő fiziológiás működésében alapvető szerepet játszik, ennek a regulációnak a megváltozása az élettani szabályozás módosulását idézheti elő, amelynek egészségre gyakorolt hatása ma még kiszámíthatatlan. Mivel ezek az eredményeink még alapvetően eredetiek, ezért érdemes ezt a megkezdett utat tovább folytatni, lehetőleg a klinikummal történő szoros kollaborációban.

Ami a xantin-inszenzítív adenzin kötőhelyek és receptorok szerepét illeti, sikerült kimutatnunk, hogy az adenzin, főleg magasabb koncentrációban képes ezek aktiválásával biológiai hatásokat létrehozni, azaz a bronchiális tónust befolyásolni. Figyelemreméltónak tartjuk, hogy ezek a hatások erőteljesebben jelentkeznek az adenzin dezamináz gátlása után. Mivel a gyógyszerek egy csoportja gátolja ezt a főként intracellulárisan lokalizálódó enzimet, másrészt munkacsoportunk korábbi vizsgálatai alapján a hipoxiás körülmények szignifikánsan csökkentik az adenzin dezamináz aktivitást, ezért a tüdő oxigénhiányos állapotaiban lehet számítani e kötőhelyek aktivitásának fokozódására. Elképzelhető, hogy az asztma vagy COPD-ben szenvedő betegek esetében ez a moduláció fokozottan jeletkezik. Ennek a jelenségnek szerepe lehet a kórélettani folyamatok magyarázatában, ugyanakkor a gyakorlati gyógyszerfejlesztés szempontjából is iránymutató lehet és a kifejlesztendő intracelluláris kötőhely modulátorok az említett gyulladásos tüdőfolyamatok farmakológiai megközelítésében is hasznosak lehetnek.

A perifériás mononukleáris sejtek felhasználásával kapott eredményeink a gyulladásos tüdőbetegségek patomechanizmusának jobb megértéséhez is hozzájárulhatnak. Az a tény, hogy az IL-1 β és az arachidonsav szerepet játszik a gyulladásos folyamatokban, továbbá az a megállapításunk, hogy az adenzin szignifikánsan – receptor altípus-függő módon – gátolja ezen inflammatorikus mediátoroknak a felszabadulását, megengedi azt a feltételezést, hogy az adenzin a szervezetben – így feltehetően a tüdőben is – koncentráció-függő gyulladásgátló hatást fejt ki. Ennek a feltételezett folyamatnak a jelentősége részben patofiziológiai, részben terápiás, hiszen az endogén adenzin koncentrációnak a gyulladásgátló hatás szempontjából optimális tartományba történő szorítása a szervezet természetes védekezőreakciójának a felerősödésével járhat.

Mindebből következik, hogy az állatkísérletekben nyert eredményeink nemcsak a patomechanizmus szempontjából lehetnek jelentősek, hanem a gyakorlati gyógyszerfejlesztés irányában is előremutatók lehetnek.

6. IRODALOM

Agarwal, K.C., Agarwal, R.P., Stoeckler, J.D., Parks, R.E., Jr , 1975, Purine nucleoside phosphorylase. Microheterogeneity and comparison of kinetic behavior of the enzyme from several tissues and species. *Biochemistry*. 14;**14**(1):79–84

Barnes, P.J., Chung, K.F., Page, C.P. 1998, Inflammatory mediators of asthma: An update. *Pharmacol. Rev.* **50**:515-596.

Barnes P.J. 2003 Theophylline: New Perspectives for an Old Drug, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **167**: 813-818.

Barthó, L., Benkő, R., Patacchini, R., Pethő, G., Holzer,-Petsche, U., Holzer, P., Lázár, Z., Undi, S., Illényi, L., Antal, A., Horváth, O.P. 2004, Effects of capsaicin on visceral smooth muscle: a valuable tool for sensory neurotransmitter identification. *Eur. J. Pharmacol.* **500**:143-157.

Berne, R.M., 1963, Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow, *Am J Physiol*, **204**, 317-322.

Bertrand, C., Da Silva, A., Landry, Y., Theodorsson,E., Tshirhart, E. 1993, An epithelial-dependent contracting factor induced by calcium influx in guinea-pig trachea. *Pulm. Pharmacol.* **6**:69-76.

Boyum, A. 1968, Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J Clin Lab Invest* **97** (Suppl.): 77-108

Brown, C.M., Collis, M.G. 1982, Evidence for an A₂/R_a adenosine receptor in the guinea-pig trachea. *Br. J. Pharmacol.* **76**:381-387

Burnstock, G., 1976, Purinergic receptors, *J Theor Biol*, **62**, (2), 491-503.

- Burnstock, G., 1980, Purinergic receptors in the heart, *Circ Res*, **46**, (6 Pt 2), I175-182.
- Chang, J., S.C. Gilman, A.J. Lewis. 1986. Interleukin 1 activates phospholipase A₂ in rabbit chondrocytes: a possible signal for IL-1 action. *J.Immunol.* **136**: 1283-1287.
- Collis, M.,G., Hourani, S.,M.,O., 1993, Adenosine receptor subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**:360-366
- Cronstein, B.N et al. 1994, Adenosine an endogenous anti-inflammatory agent. *J. Appl. Physiol.* **76**, 5-13
- Cronstein, B.,N., Van de Stouwe, M., Druska, L., Levin, R.I., Weissmann, G.,1994, Nonsteroidal antiinflammatory agents inhibit stimulated neutrophil adhesion to endothelium: adenosine dependent and independent mechanisms. *J. Inflamm.* **18**: 323–335
- Dessauer, C., W., Tesmer, J., J., Sprang, s., R., Gilman, A., G., 1999, The interactions of adenylylate cyclase with P-site inhibitors; *Trends Pharmacol Sci*, **20**(5), 205-210
- Drury, A.,N., Szent-Györgyi, A., 1929, The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their actions upon the mammalian heart. *J. Physiol. London* **68**:213-237
- Eglen, R.,M., Harris, G.,C., Taylor, M., Pfister, J.,R., Whiting, R.,L., 1991, Characterization of muscarinic receptors mediating release of epithelial derived relaxant factor (EpDRF) in guinea-pig isolated trachea. *Naunyn-Schmideberg's Arch. Pharmacol.* **344**:29-35
- Fernandes, L.,B., Paterson, J.,W., Goldie, R.,G., 1989, Co-axial bioassay of a smooth muscle relaxant factor released from guinea-pig tracheal epithelium. *Br. J. Pharmacol.* **96**:117-124
- Fozard, J.,R., 2003, The case for a role for adenosine in asthma: almost convincing? *Current Opinion Pharmacol.* **3**:264-269
- Fredholm, B.,B., 1982, Adenosine actions and adenosine receptors after 1 week treatment with caffeine. *Acta Physiol. Scand.* **115**:283-286

- Fredholm, B.B., Ijzerman, A.P., Jacobson, K.A., Klotz, K.N., Linden, J. 2001, International union of pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* **53**: 352–527
- Fredholm, B.,B. Jacobson, K.A.; Klotz, K.N.; Linden, J., 2001, International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors, *Pharmacol Rev*, **53**, (4), 527-552.
- Gomez, G., Sitkovsky, M.,V.,. 2003, Targeting G protein-coupled A_{2a} adenosine receptors to engineer inflammation in vivo. *Int J Biochem Cell Biol* **35**:410-414.
- Haskó, Gy. Cronstein, N.C. 2004 Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity *TRENDS in Immunol* vol **25**; No 1 Jan, 33-39
- Hay, D.,W.,P., Muccitelli, R.,M., Page,, C.,P., Spina, D. 1992, Correlation between airway epithelium-induced relaxation of rat aorta in the co-axial bioassay and cyclic nucleotide levels. *Br. J. Pharmacol.* **105**:954-958
- Hay, D.,W.,P., Van Scott, M.,R., Muccitelli, R.,M., 1997, Characterization of endothelin release from guinea-pig tracheal epithelium: Influence of proinflammatory mediators including major basic protein. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **10**:189-198
- Johansson, B., Georfiev, V., Lindström, K., Fredholm, B.,B., 1997,. A₁ and A_{2A} adenosine receptors and A₁ mRNA in mouse brain: effect of long-term caffeine treatment. *Brain Res.*, **762**:153-164
- Krump, E. and Borgeat,P., 1999,. Adenosine. An endogenous inhibitor of arachidonic acid release and leukotriene biosynthesis in human neutrophils. *Adv Exp Med Biol* **447**:107-115.
- Liu, A.,M.F., and Yong.,Y.,U., 2004. G₁₆-mediated activation of Nuclear Factor κ B by the A₁ receptor involves c-Src, protein kinase C, and ERK signalling. *J.Biol. Chem.* **279**:53196-204.
- Londos, C., Wolff, J.. ; 1977, Two distinct adenosine-sensitive sites on adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **74** (12):5482–5486

Londos, C., Cooper, D.M.F. and Wolf, J. 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**. 2551-2554.)

Losinski, A. , Alexander , S.,P.,H., 1995, Adenosine receptor-mediated relaxation of guinea-pig precontracted, isolated trachea *Br.J. Pharmacol.* **116**: 2425-2428

Majumdar, S., and Agarwal, B.,B., 2003, Adenosine suppresses activation of nuclear factor- κ B selectively induced by tumor necrosis factor in different cell types. *Oncogene* **22**:1206-1218.

Marone, G., and Casolaro, V. 1990, Basophil and mast cell releasability in allergic disorders. *In: Cellular Communications in Allergic Asthma* (S.G.O. Johansson, ed.). *AW Grafiska, Uppsala*, 45-53.

Martin, C., Leone, M., Viviani, X., Ayem, M.,L., and Guieu, R., 2000, High adenosine plasma concentration as a prognostic index for outcome in patients with septic shock. *Crit Care Med* **28**:3198-3202

Morri, H., Ozaki, M., Y.Watanabe. 1994, 5'-flanking region surrounding a human cytosolic phospholipase A₂ gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**: 6-11.

Németh, Z.,H., Leibovich, S.,J., Deitch, E.,A., Sperlágh.,B., Virág, L., Vizi, E.,S., Szabó, C., Haskó, G., 2003, Adenosine stimulates CREB activation in macrophages via a p38 MAPK-mediated mechanism. *Biochem Biophys Res Comm* **312**:883-888.

Olsson, R.,A., 1992, Mechanism of action of adenosine. *Coron. Art. Dis.* **3**:1116-1121

Palmer, T.,M., Stiles, G.,L., 1999, Stimulation of A_{2A} adenosine receptor phosphorylation by protein kinase C activation: evidence for regulation by multiple protein kinase C isoforms. *Biochemistry* **38**: 14833-14842.

Poulsen, S.A., Quinn, R.,J., 1998, Adenosine receptors: new opportunities for future drugs, *Bioorg Med Chem*, **6**, (6), 619-641.

Sipka, S., Seres, T., Dinya, Z., Szekanecz, Z., Szentmiklósi, A.,J., Bodolay, E., Szegedi, G., 1995, Tumour necrosis factor- α and adenosine in endotoxin shock related cardiovascular symptoms. *Mediators of Inflammation* **4**:454-455

Sipka, S., Szántó, S., Szűcs, K., Kovács, I., Kiss, E., Antal-Szalmás, P., Lakos, G., Aleksza, M., Illés, Á., Gergely, P., Szegedi, G., 2001, Decreased arachidonic acid release in peripheral blood monocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* **28**:2012-2017.

Sipka, S., Kovács, A.,I., Szántó, S., Szegedi, Gy., Brugós,L., Bruckner, G., Szentmiklósi, A.,J.,2005. Adenosine inhibits the release of interleukine-1 β in acivated human peripheral mononuclear cells. *Cytokine* **31**: 258-263.

Szentmiklósi, A.,J., Németh, M., Cseppentő, Á., Szegi, J., Papp, Gy.,J.,Szekeres, L. 1982, Potentiation of the Myocardial Actions of Adenosine in the Presence of Coformycin, a Specific Inhibitor of Adenosine Deaminase *Arch.int. Pharmacodyn.* **256**: 236-252

Szolcsányi, J., 1996, Capsaicin-sensitive sensory nerve terminals with local and systemic efferent functions: facts and scopes of an unorthodox neuroregulatory mechanism. *Prog. Brain Res.* **113**:343-359.

Tschirhart, E., Bertrand, C., Theodorsson, E., Landry, Y., 1990, Evidence for the involvement of calcitonin gene-related peptide in the epithelium-dependent contraction of guinea-pig trachea in response to capsaicin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **342**:177-181

Trincavelli, M.L.; Tuscano, D.; Marroni, M.; Falleni, A.; Gremigni, V.; Ceruti, S.; Abbracchio, M.P.; Jacobson, K.A.; Cattabeni, F.; Martini, C., 2002, A3 adenosine receptors in human astrocytoma cells: agonist-mediated desensitization, internalization, and down-regulation, *Mol Pharmacol*, **62**, (6) 1371-1384

Varani, K., Portaluppi, F., Merighi, S., Ongini, E., Belardinelli, L., Borea, P.,A., 1999,. Caffeine alters A_{2A} adenosine receptors and their function in human platelets. *Circulation*, **99**:2499-2502

Varani, K., Portaluppi, F., Gessi, S., Merighi, S., Ongini, E., Belardinelli, L., Borea, P.,A., 2000, Dose and time effects of caffeine intake on human platelet adenosine A_{2A} receptors. Functional and biochemical aspects. *Circulation* **102**:285-289

Victor-Vega, C., Desai, A., Montesinos, M.,C., Cronstein, B.,N., 2002, Adenosine A_{2A} receptor agonists promote more rapid wound healing than recombinant human platelet-derived growth factor (Becaplermin Gel). *Inflammation* **26**: 19-24

Wu, T., C. Han, J.,H. Shelhamer. 2004, Involvement of p38 and p42/44 MAP kinases and protein kinase C in the interferon-gamma and interleukin-1 alpha induced phosphorylation of 85-kDa cytosolic phospholipase A₂ in primary human epithelial cells. *Cytokine* **25**: 11-20.

Zhang, Y., Wells, J.,N., 1990,. Effect of chronic caffeine administration on peripheral adenosine receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **254**:270-276

Zimmerman, T., P., Schmitges, C., J., Wolberg, G., R D Deeprose,R.,D., Duncan,G., S., Cuatrecasas, P., Elion, G., B., ; 1980, Modulation of cyclic AMP metabolism by S-adenosylhomocysteine and S-3-deazaadenosylhomocysteine in mouse lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **77**(10): 5639–5643.

7. TÁRGYSZAVAK

Adenozin, Adenozin receptorok, Koffein, Trachea simaizom, IL-1 β , arachidonsav, gyulladás, asztma bronchiale

Adenosine, Adenosine receptors, Caffeine, Tracheal smooth muscle, IL-1 β , arachidonic acid, inflammation, bronchial asthma

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Nem volt egyszerű míg összeállt ebben a formájában a dolgozat. Az eddig elvezető út hosszú volt, de nagyon sokan álltak mellettem, és nekik köszönetet kell mondanom. Kinek a segítségért, kinek a példamutatásért, kinek a türelméért, kinek pedig mindenért. A téma választásánál dr Édes István

professzor úr tevékenysége, tudományos munkája és példája késztetett arra, hogy ideje lenne hozzáfogni. Köszönöm szépen segítségét, érdeklődését, tanácsait és ösztönzését. Dr. Szentmiklósi József, a témavezetőm, akinek a nemzetközi porondon is elismert adenozin kutatása és ebben a témában szerzett tapasztalata tette lehetővé, hogy kiválasszam, és a munkát véghezvigyük.

Köszönöm szépen a rám szánt idejét, türelmét és emberi jóságát.

A „Farmakológiai Intézet” lett „második otthonom”, minden egyes munkatársának köszönöm, de külön kiemelném Dr. Cseppentő Ágnes, Dr. Gesztelyi Rudolf, Dr. Zsuga Judit, Hauszman Éva és Pásti Lajosné nélkülözhetetlen segítségét és további sikereket kívánok tudományos munkájukban és az életben egyaránt.

Külön szeretném kiemelni Dr. Sipka Sándor professzor úrnak segítségét, útmutatását és példáját, és rengeteg konkrét segítségét, ami ösztönzően hatott rám. Az ő személyes segítése és ösztönzése nélkül szintén nem jöhetett volna létre a dolgozat.

„Első munkahelyemnek” a Tüdőgyógyászati Klinikának is sokat köszönhetek, talán mindent. Elsősorban, hogy lehetővé tette munkám elvégzését, befejezését, sőt számtalan ösztönzést, bátorítást és segítséget kaptam végig az évek során. Dr. Szilasi Mária professzor asszonynak köszönetet mondok mindazért a szakmai és emberi támogatásért, ami nélkül most nem állhatnék, itt ahol állok. Dr. Magyar Pál professzor úr nagyon sokat ösztönzött, hogy fejezzem be a munkát. Sajnos őt egy tragikus balaset elragadott az élők sorából, de így is nagyon sokat gondoltam és gondolok rá, mert végig éreztem segítő szándékát.

Végül, de nem utolsósorban családomnak szeretném megköszönni, feleségemnek, fiamnak és lányomnak, hogy munkám alatt érezhettem megértő hozzáállásukat és így velük együtt örülhetek a feladat teljesítésének.

A disszertáció anyagának kidolgozásához a következő pályázatok nyújtottak anyagi lehetőséget:

ETT 307/96, ETT 432/2000, ETT 111/2003, ETT 202/2003, OTKA T037531, ETT 586/2006 és TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045.

A kísérletekhez szükséges MAB engedélyek száma: DE MAB 45/2001 és 7/20033.

Iktatószám: DEENKÉTK/69/2013.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Brugós László

Neptun kód: B13FZB

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Brugós, L.**, Gesztelyi, R., Zsuga, J., Cseppentő, Á., Benkő, I., Galajda, Z., Deák, G., Sipka, S., Rószter, T., Kovács, P., Szilasi, M., Édes, I., Szentmiklósi, J.A.: Modulation of adenosine-induced response in the guinea pig trachea during long-term caffeine treatment: Possible role of epithelium.
J. Pharmacol. Sci. 105 (3), 279-290, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1254/jphs.FP0070214>
IF:2.408
2. Sipka, S., Kovács, I., Szántó, S., Szegedi, G., **Brugós, L.**, Bruckner, G., Szentmiklósi, J.A.: Adenosine inhibits the release of arachidonic acid and its metabolites (AAM) in activated human peripheral mononuclear cells.
Inflamm. Res. 56 (11), 468-472, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-007-7102-6>
IF:1.504
3. Sipka, S., Kovács, I., Szántó, S., Szegedi, G., **Brugós, L.**, Bruckner, G., Szentmiklósi, J.A.: Adenosine inhibits the release of interleukin-1beta in activated human peripheral mononuclear cells.
Cytokine. 31 (4), 258-263, 2005.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2005.05.002>
IF:2.012

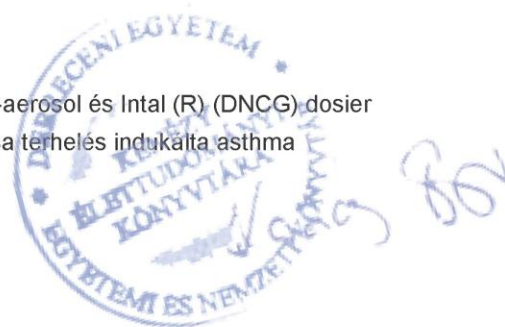


További Közlemények

4. Szilasi M., **Brugós L.**: A légzőrendszer öregedése és betegségei.
In: Klinikum és farmakoterápia időskorban. Szerk.: Boga Bálint, Samu Antal, Vox Medica Kiadói Kft., Veszprém, 237-254, 2012.
5. **Brugós L.**: Desloratadin a szezonális allergiás rhinitis (SAR) kezelésében.
Med. Thorac. 62 (5), 43-45, 2009.
(Ismertetett dokumentum Bachert C., Virchow C. J., Plenker A : Desloratadine in the treatment of seasonal allergic rhinitis. In: Clinical drug investigation - 22 : Suppl. 2. (2009), p. 43-45 - ISSN 1173-2563)
6. Szilasi M., **Brugós L.**, Rajnavölgyi É., Sipka S.: Alternatíva-e az alternatív-komplementer gyógyítás parlagfű-allergiákban?
Allerg. Klin. Immun. 12 (4), 94-98, 2009.
7. **Brugós L.**: A mellhártya, a mediastinum és a rekesz betegségei.
In: Tüdőgyógyászat : egyetemi jegyzet 3. bővített kiadás. Szerk.: Kardos Tamás, DE OEC Elnökségi Hivatal, Debrecen, 284-287, 2008.
8. **Brugós L.**: A pneumothorax.
In: Tüdőgyógyászat : egyetemi jegyzet 3. bővített kiadás. Szerk.: Kardos Tamás, DE OEC Elnökségi Hivatal, Debrecen, 287-290, 2008.
9. **Brugós L.**: Inhalált anyagok okozta akut tüdőkárosodás.
In: Tüdőgyógyászat : egyetemi jegyzet 3. bővített kiadás. Szerk.: Kardos Tamás, DE OEC Elnökségi Hivatal, Debrecen, 299-301, 2008.
10. **Brugós L.**: Az EKG jelentősége a pulmonológiai gyakorlatban.
In: Tüdőgyógyászat : egyetemi jegyzet 3. bővített kiadás. Szerk.: Kardos Tamás, DE OEC Elnökségi Hivatal, Debrecen, 33-37, 2008.
11. **Brugós L.**: COPD (krónikus obstruktív tüdőbetegség) I. rész.
In: Tüdőgyógyászat : egyetemi jegyzet 3. bővített kiadás. Szerk.: Kardos Tamás, DE OEC Elnökségi Hivatal, Debrecen, 83-97, 2008.
12. **Brugós L.**: A légúti allergiás kórképek fogalma, kritériumai, patogenezisének alapjai
In: Tüdőgyógyászat : egyetemi jegyzet 3. bővített kiadás. Szerk.: Kardos Tamás, DE OEC Elnökségi Hivatal, Debrecen, 103-108, 2008.

13. **Brugós L.**: Fertőző betegségek.
In: Tüdőgyógyászat : egyetemi jegyzet 3. bővített kiadás. Szerk.: Kardos Tamás, DE OEC Elnökségi Hivatal, Debrecen, 166-186, 2008.
14. **Brugós L.**: A tüdőátályog.
In: Tüdőgyógyászat : egyetemi jegyzet 3. bővített kiadás. Szerk.: Kardos Tamás, DE OEC Elnökségi Hivatal, Debrecen, 186-189, 2008.
15. **Brugós L.**: Tuberculosis.
In: Tüdőgyógyászat : egyetemi jegyzet 3. bővített kiadás. Szerk.: Kardos Tamás, DE OEC Elnökségi Hivatal, Debrecen, 189-208, 2008.
16. Mikáczó A., **Brugós L.**, Szilasi M.: Mellkasi folyadékgyülem differenciál-diagnózisa során szerzett tapasztalataink.
Med. Thorac. 61 (6), 314-316, 2008.
17. Pethő Z., Szabó Z., **Brugós L.**, Nemes Z., Szöllősi Z., Sándor Z., Pápay Z., Szekanecz Z.: Mellkasi lágyrésztumor: Rheumatoid csomó? : esetismertetés.
Magyar Reumatol. 49, 172, 2008.
18. Sipka, S., **Brugós, L.**, Aleksza, M., Gyimesi, E., Szabó, Z., Csípő, I., Páll, G., Kossarova, K., Szilasi, M.: Systemic anti-inflammatory changes in subjects with ragweed-induced allergic rhinitis treated with intranasal budesonide and oral loratadine.
Allerg. Klin. Immun. 11 (1), 16-20, 2008.
19. Szilasi M., **Brugós L.**, Bácsi A., Rajnavölgyi É.: Parlagfű-érzékeny, allergiás rhinoconjunctivitisben szenvedő betegeknél alkalmazott kecsketej hatékonyságának vizsgálata.
Allerg. Klin. Immun. 11 (1), 6-11, 2008.
20. **Brugós L.**: A leukotriének szerepe az asztmás gyulladásban.
Amega. 14 (5), 21-26, 2007.
21. **Brugós L.**: Hogyan ismerjük fel a COPD-t?
Családorv. Fórum. 9, 7-11, 2006.
22. Szilasi M., Horváth Á., Dolinay T., Szántó J., **Brugós L.**, Lengyel L., Kiss S.S., Kiss M., Adamecz Z.: IIIA-B stádiumú NSCLC elsővonalbeli Taxotere-Cisplatin konkuráló kemo-radioterápiájának eredményei 42 irresekábilis daganatos beteg vizsgálata alapján.
Magyar Onkol. 50 (3), 233-236, 2006.

23. Varga I., **Brugós L.**, Farkas M., Szilasi M.: Bronchoszkópia az intenzív osztályokon.
Orv. Hetil. 145 (18), 957-961, 2004.
24. Dolinay T., Csiki Z., **Brugós L.**, Sebesi J., Szilasi M.: Asthma bronchialis betegek életminőségének vizsgálata *Helicobacter pylori* eradikációt követően.
Endoscopia. 4 (4), 69-72, 2001.
25. Szabó, Z., Szilasi, M., **Brugós, L.**, Szántó, S., Kovács, I., Széles, M., Lakos, G., Antal-Szalmás, P., Édes, I., Sipka, S.: Differences in the changes of allergen-specific IgE serum levels and the chemiluminescence of peripheral blood phagocytes in patients with allergic rhinoconjunctivitis during the ragweed season.
Immunol. Lett. 74 (3), 201-205, 2000.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2478\(00\)00263-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2478(00)00263-7)
IF:1.546
26. Szilasi M., **Brugós L.**, Dolinay T.: A krónikus aspecifikus légzőszervi betegségek és a levegőszennyezés kapcsolatának vizsgálata.
Med. Thorac. 53 (1), 21-26, 2000.
27. **Brugós L.**, Sipka S., Szilasi M., Szabó Z., Lakos G., Antal P., Édes I., Szegedi G.: Halolaj-kapszula adagolás hatása parlagfű okozta allergiás rhino-conjunctivitisben.
Allerg. Klin. Immun. 2 (1), 42-47, 1999.
28. Varga I., Koncz A., **Brugós L.**, Szilasi M., Szakács É.: Első tapasztalataink a légúti stent-tel.
Med. Thorac. 51 (4), 154-157, 1998.
29. **Brugós L.**, Szilasi M., Mihóczy L., Fülöp I., Faragó E.: Az antituberkulotikus kezelés során észlelt gyógyszerrezisztencia alakulása 1987 és 1993 között.
Med. Thorac. 50 (8), 425-432, 1997.
30. Csontos Z., Szilasi M., **Brugós L.**: A peak flow méter szerepe az asthma bronchiale diagnosztikájában és terápiájában.
Med. Thorac. 48 (12), 465-472, 1995.
31. Szilasi M., **Brugós L.**, Kaló I., Mihóczy L.: Ditec (R) dossier-aerosol és Intal (R) (DNCG) dossier aerosol készítmények védőhatásának összehasonlítása terhelés indukálta asthma bronchiáléban.



32. Szilasi M., **Brugós L.**, Kaló I., Mihóczy L.: A Serevent (R) (Salmeterol) dossier aerosol klinikai és légzésfunkciós hatásának vizsgálata Berodual (R) dossier aerosol-lal összehasonlítva.
Med. Thorac. 47, 139-149, 1994.
33. Szilasi M., Csontos Z., Faragó E., **Brugós L.**: A parlagfű (Ragweed) okozta allergiás rhinitis kezelése során észlelt jellegzetességek, tapasztalatok.
Med. Thorac. 45 (10), 539-545, 1992.
34. Szilasi M., Lánszki I., Németh M., Csontos Z., **Brugós L.**: Parlagfű (Ambrosia elatior, ragweed) visszaszorítási programtervezet lépcsőzetes megvalósítása Kelet-Magyarországon.
Med. Thorac. 45 (10), 547-551, 1992.

Összesített impakt faktor: 7.47

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 5.924

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2013.02.08



