

Az adenosin-dezamináz gátlás hatása az interstitialis adenosin-szintre eu- és hyperthyreoid tengerimalac pitvaron

Erdei Tamás

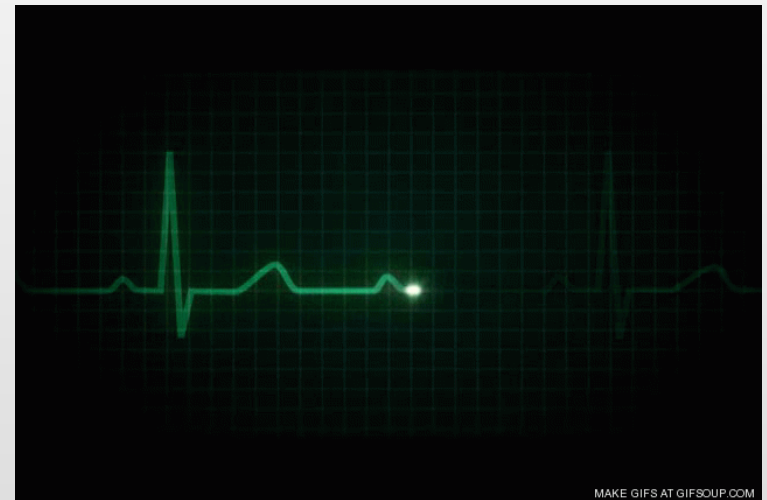
IV. éves gyógyszerészhallgató

Témavezető: Dr. Gesztelyi Rudolf

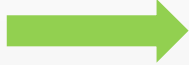
DE GYTK Gyógyszerhatástani Tanszék

Előzmények

- Az ischaemiás szívbetegség prevalenciája az utóbbi évtizedekben globálisan is jelentősen megnőtt
- Cél: a szív ischaemiával szembeni toleranciájának növelése
- Az általunk vizsgált A_1 adenzinerg rendszer ilyen lehetőséget hordoz magában



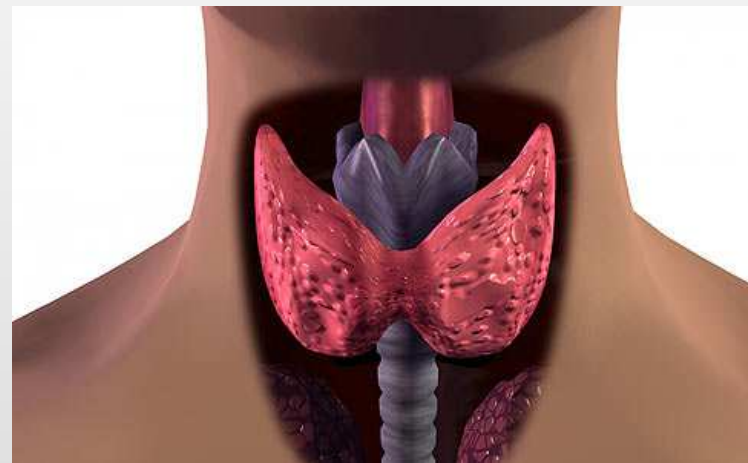
Bevezetés I.

- Az adenzin az ATP metabolizmusának egyik szereplője, ami adenzin receptorokhoz kötődik
- A szívben a legfontosabb receptor típus: myocardialis A_1 adenzin receptor  protektív és regeneratív hatások
- Receptor aktiválódás után negatív inotróp hatás



Bevezetés II.

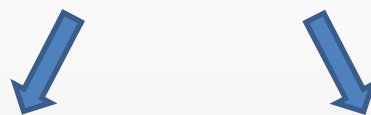
- Hyperthyreosis
 - számos anyagcsere folyamatot serkent → növeli a szív munkáját
 - elnyomja az A_1 receptorok által mediált hatásokat
- Fontos az adenozinerg rendszer vizsgálata a különböző thyreoid állapotokban



Adenozin-dezamináz gátlás

Adenozin-dezamináz (ADA) gátlás hatására stimulálódik az adenozinerg rendszer (*ex vivo* jelentőség)

ADA gátlás



- A_1 receptor által mediált negatív inotróp hatás (régóta ismert)
- Az interstitialis adenozin-szint növekedése okozza
- Az A_1 receptor negatív inotróp hatást kiváltó képességének növekedése (Kemény-Beke és mtsai, 2007)
- Az intracelluláris adenozin-szint növekedése okozhatja

Célunk

- Az ADA gátlás hatására felszaporodó interstitialis adenzin kvantifikálása eu- és hyperthyreoid tengerimalacok pitvarában

A probléma

- A felszaporodó interstitialis adenzin torzulást okoz az A_1 agonistával felvett E/c görbén, mivel elhasználja az A_1 receptorok válaszadási kapacitásának egy részét még a E/c görbe felvétele előtt



A torzulásból kiszámolható a koncentráció

- De: A_1 receptor agonista alkalmazása mellett ez **nem** határozható meg pontosan ADA gátlás esetén
- Oka: az ADA gátlás növeli az A_1 receptor jelátviteli hatékonyságát, így befolyásolja a torzulás mértékét

Megoldás

- 1. lépés:
 - A_1 receptor agonista helyett M_2 muszkarin receptor agonista metakolint (MC) alkalmazunk
 - Az M_2 receptor hasonló hatásokat mediál a myocardiumban, mint az A_1 receptor
 - A két receptor posztreceptoriális jelátviteli útvonalai a negatív inotrópiát illetően gyakorlatilag megegyeznek
- 2. lépés:
 - Az ADA gátlás hatása a muszkarinerg rendszerre ellenőrizhető, ha antagonizáljuk az A_1 receptort, így az interstitialis adenzin nem válthat ki torzulást

Anyagok

L- tiroxin (T_4)

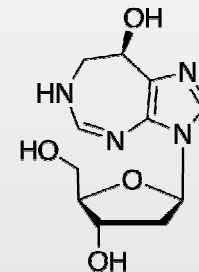
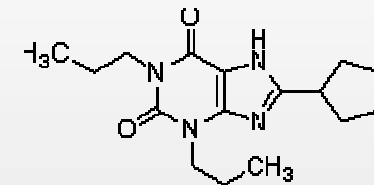
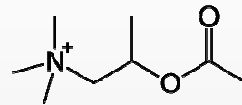
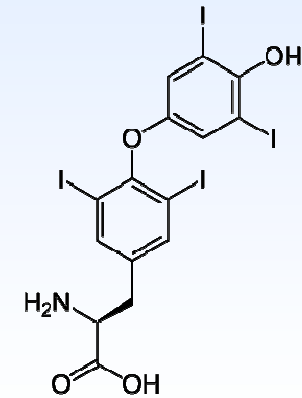
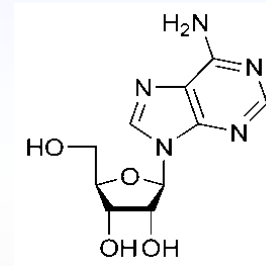
Adenozin

Metakolin (MC)

8-ciklopentil-dipropilxantin (CPX)

2-dezoxikoformicin (DCF)

Krebs-oldat

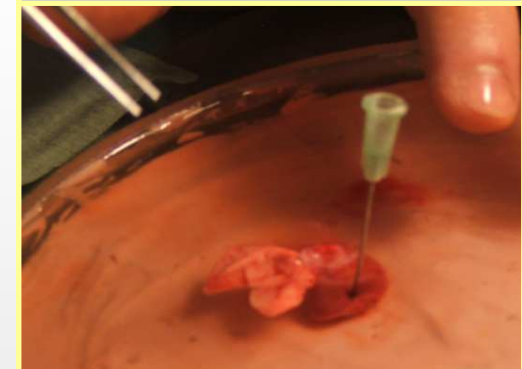
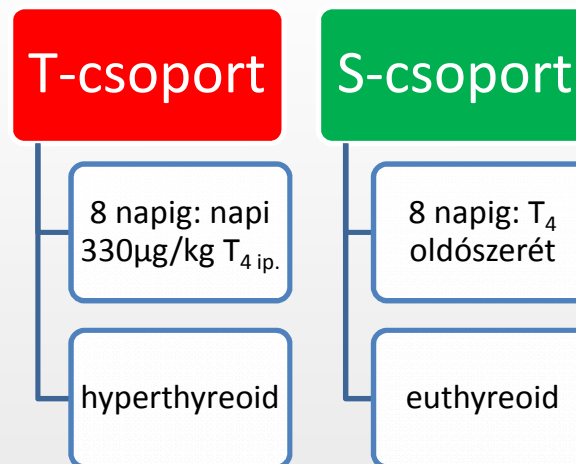


Állatok és preparátumok

- A kísérletekhez hím Hartley tengerimalacokat használtunk (600-800 g), mert a tengerimalac A_1 receptora mutatja a legnagyobb homológiát az emberével



- 2 in vivo csoport:

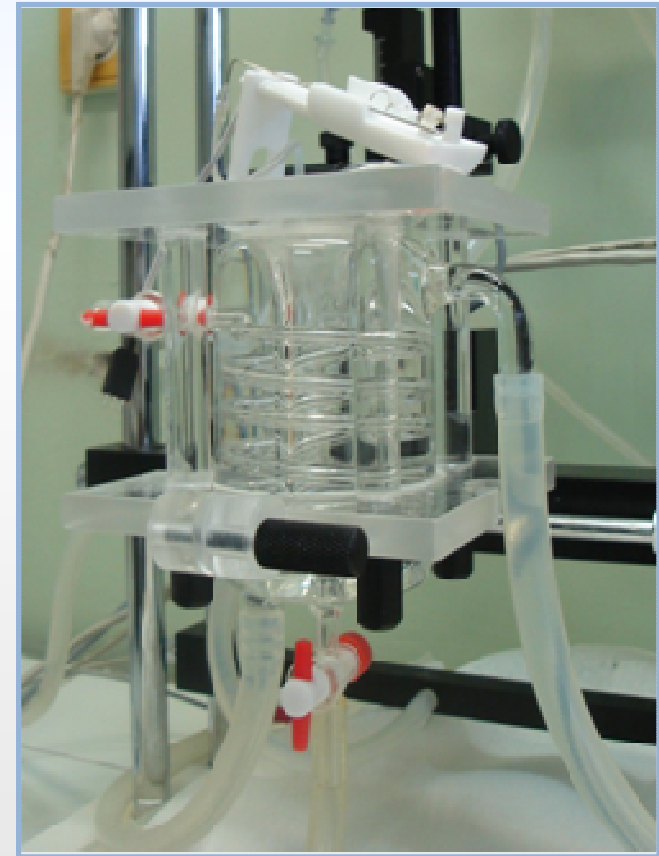


Pitvar izolálása

- Az állatokat a 9. napon dekapitáltuk, az izolált bal pitvarokat karbogénnel szellőztetett, Krebs-oldattal töltött szervkádakban függesztettük fel (36 °C; pH=7.4)

Preparátumok

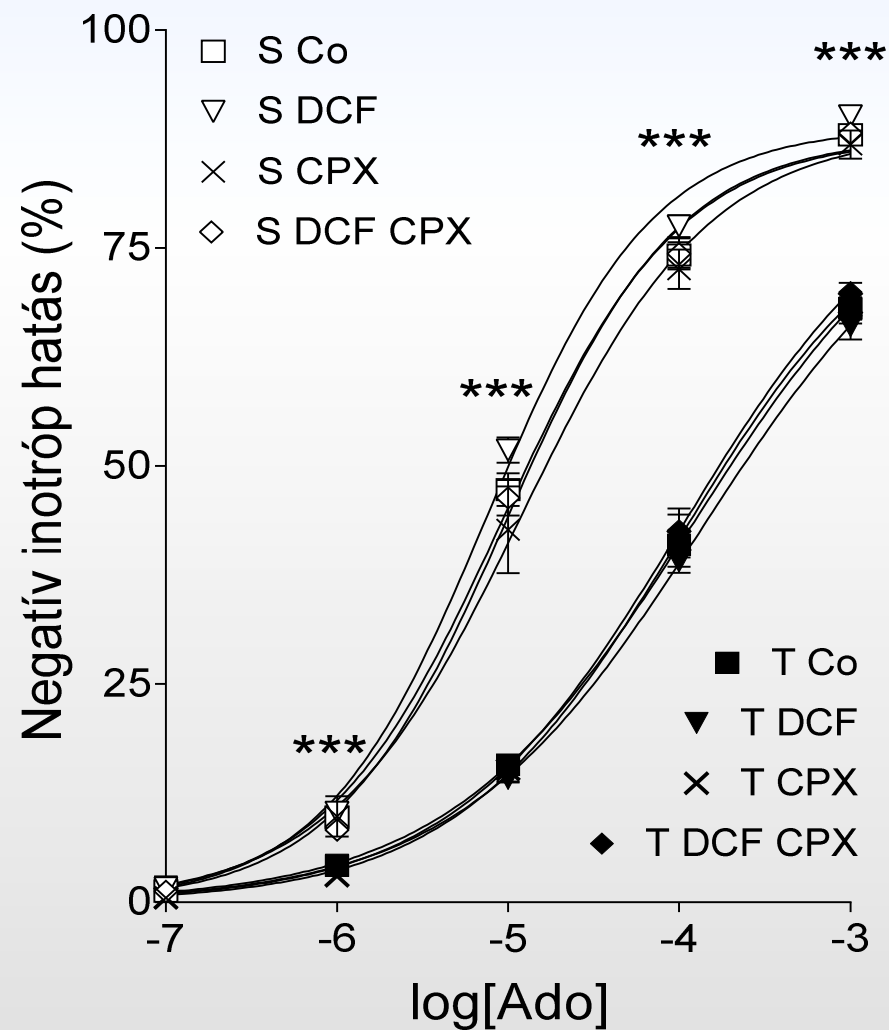
- A pitvarokat kétszeres küszöb feszültséggel ingereltük (3 Hz, 1 ms, kb. 1V)
- A kontrakciós erőt - mint az izometriás összehúzódások amplitúdóját - transzducerrel mértünk és hőírókaros poligráffal rögzítettünk



A szervkád felépítése

Adenozin E/c görbe

- Felvettük az adenozin E/c görbét az in vitro kezelés előtt.
 - A pitvarokon van működő A_1 receptor
 - A hatás szignifikánsan különbözik a két thyreoid állapotban
- Mosás után a pitvarokat in vitro kezeltük



In vitro csoportok

- 20 perces inkubációs kezelés
 - Krebs-oldatban: S Co, T Co (kontroll csoportok)
 - 10 μM CPX: S CPX, T CPX (A_1 receptor gátlás)
 - 10 μM DCF: S DCF, T DCF (ADA gátlás)
 - 10 μM DCF és 10 μM CPX: S DCF CPX, T DCF CPX (ADA és A_1 receptor gátlás)
- Majd kumulatív MC E/c görbét vettünk fel

A E/c görbék jellemzése

- A görbék leírásához a Hill-egyenletet használtuk:

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

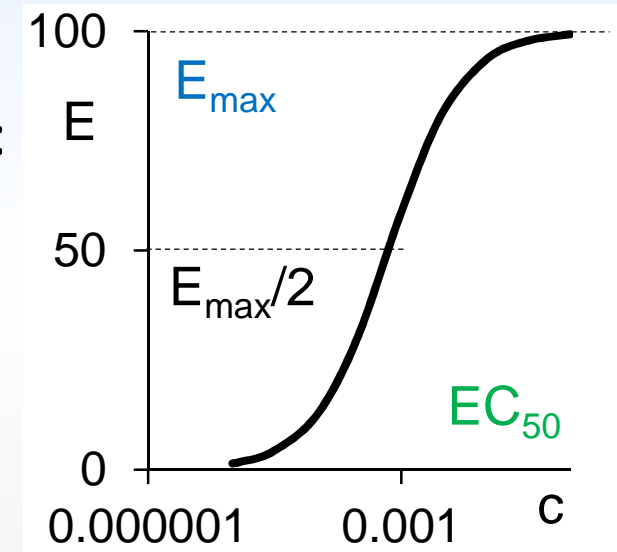
ahol: E: hatás

c: agonista koncentráció

E_{\max} : a kiváltható maximális hatás

EC_{50} : a maximális hatás feléhez tartozó koncentráció;

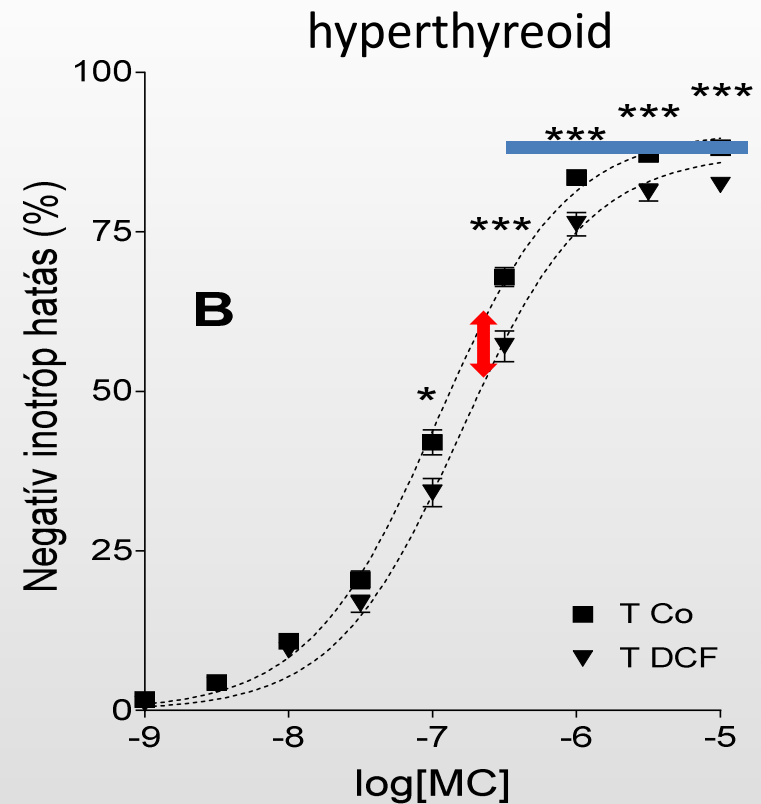
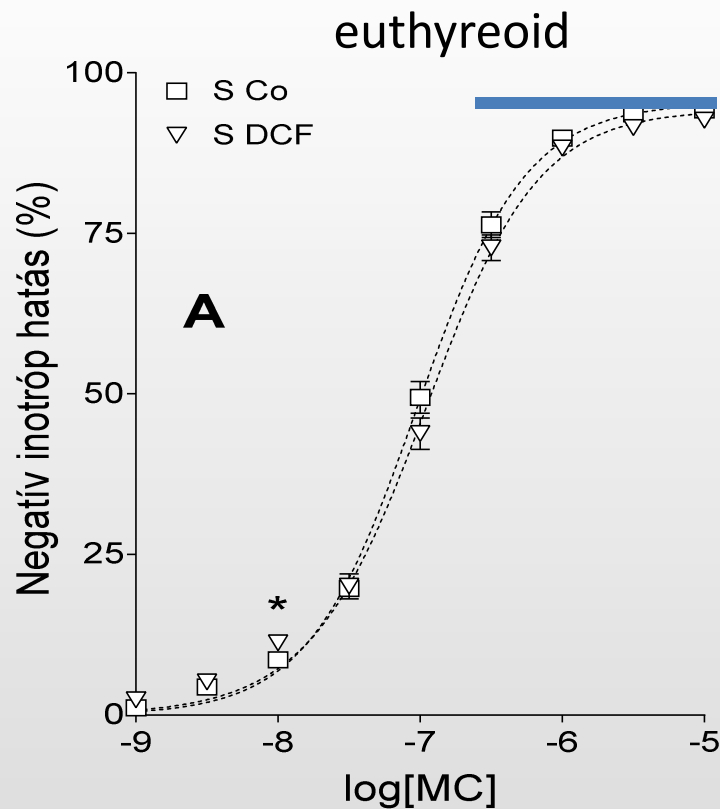
n : Hill koefficiens



- A Hill paramétereket (E_{\max} , EC_{50} , n) felhasználtuk:
 - a statisztikai elemzéshez
 - a torzult E/c görbék matematikai korrekációjához

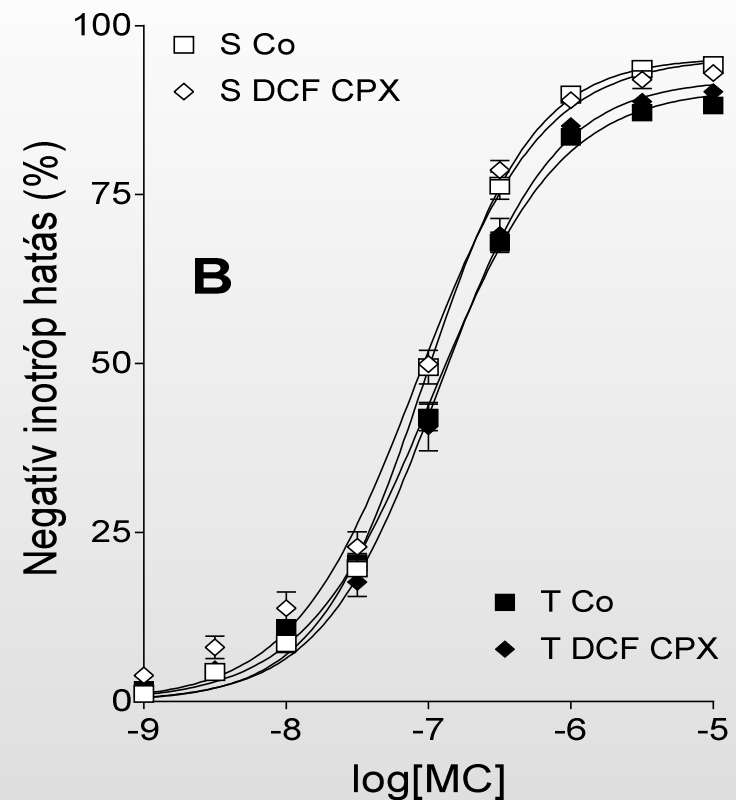
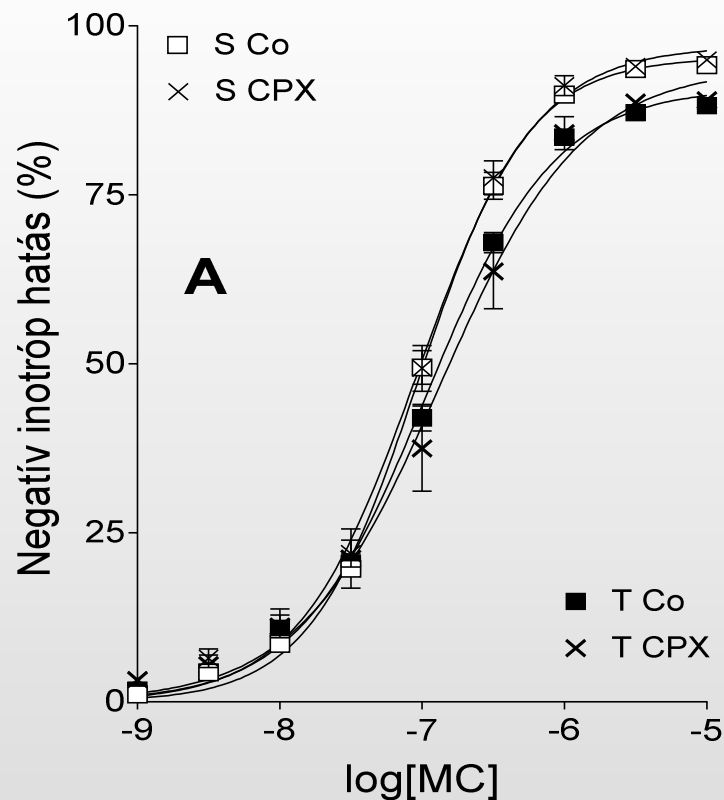
MC E/c görbék I.

- A MC is képes direkt negatív inotróp hatást létrehozni
- Hyperthyreosisban kisebb E_{max} \rightarrow a T_4 elnyomja a hatást
- Hyperthyreoid pitvaron **szignifikáns** az ADA gátlás torzító hatása (melyet az interstitialis adenzin többlet okoz)



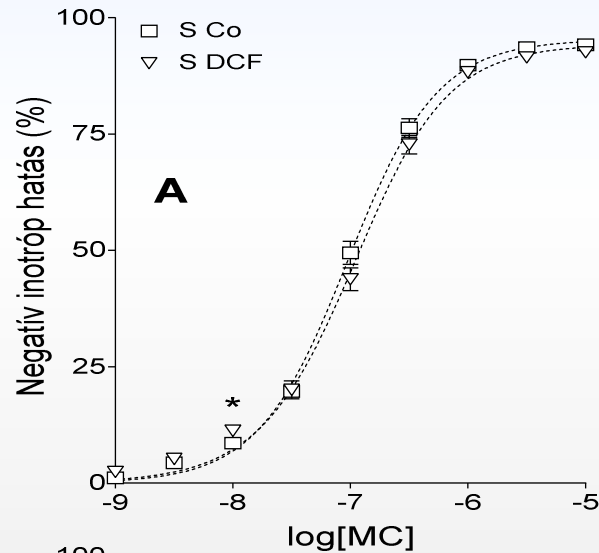
MC E/c görbék II.

- A ábra:
 - Nincs különbség a kontroll és a CPX görbék között → az alap endogén adenoszin-szint hatása elhanyagolható
- B ábra:
 - Nincs eltérés a kontroll és a DCF CPX görbék közt → a CPX kivédte az ADA gátlás torzító hatását, továbbá az ADA gátlás nem növeli az M₂ receptor negatív inotróp hatékonyságát



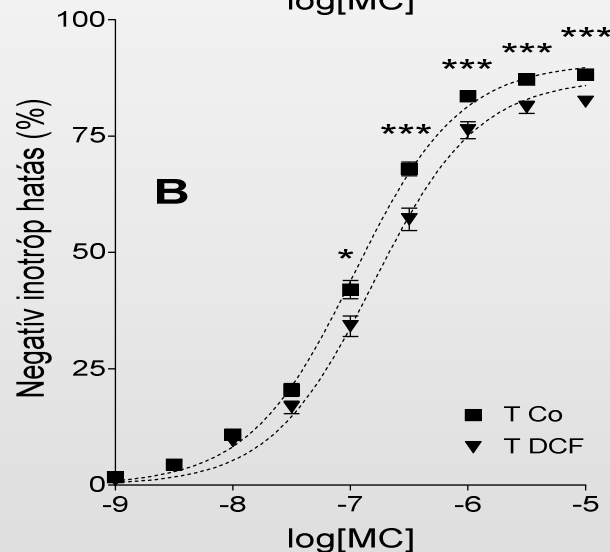
Receptoriális válaszkészség módszer (RRM)

- Görbe illesztésen alapul: a lenti egyenletet illesztettük a torzult MC E/c görbékre
- Megadja a többlet interstitialis adenzinnal egyenlő hatású MC koncentrációt (c_x)



$c_x = 28.05 \text{ nmol/l}$ metakolin (euthyreoid)

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



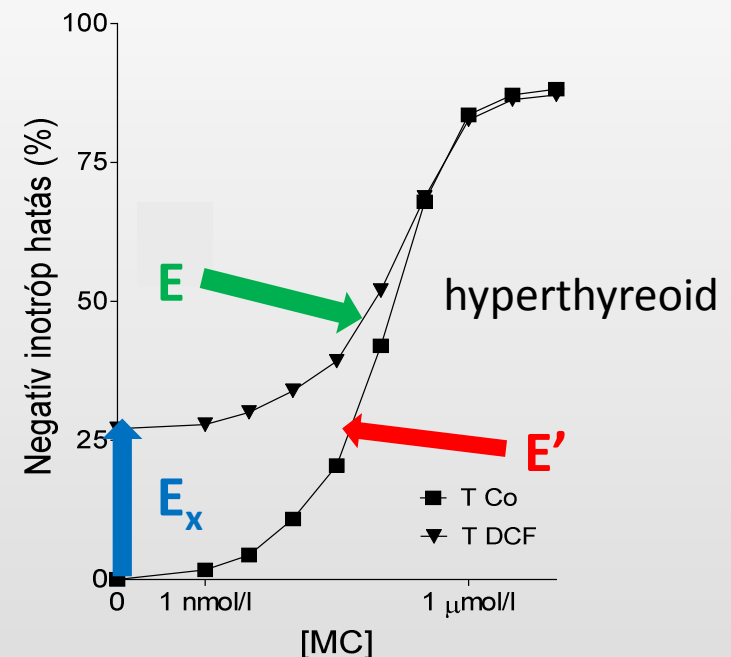
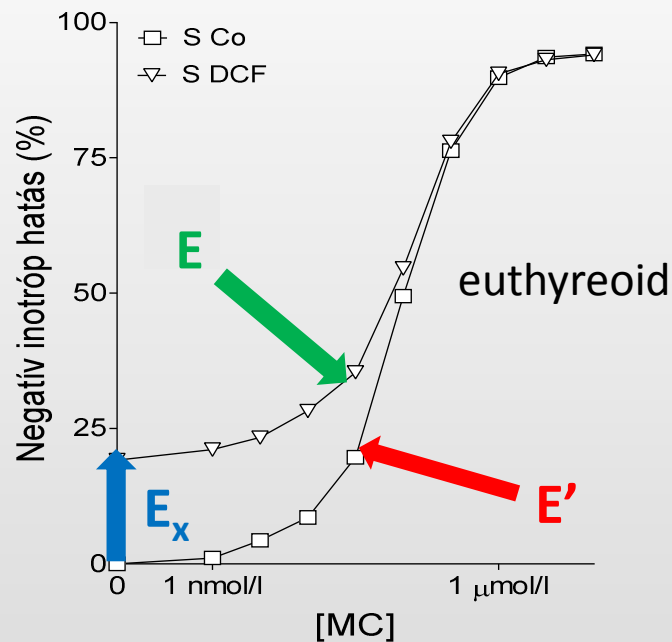
$c_x = 44.36 \text{ nmol/l}$ metakolin (hyperthyreoid)

Korrigált MC E/c görbék

- A mért c_x -ből kiszámoltuk az E_x -et, amiből meghatározható a korrigált hatás:

$$E = 100 - \frac{(100 - E') \cdot (100 - E_x)}{100}$$

- A korrigált görbék (E) végpontja a MC által kiváltható maximális hatást mutatja: nincs eltérés a kontroll és a DCF görbék között (mivel az ADA gátlás nem fokozta az M_2 receptor jelátviteli hatékonyságát)



Következtetések

1. Az ADA gátlás nem növeli az M_2 muszkarinerg rendszer jelátviteli hatékonyságát (tehát az A_1 adenozinerg rendszerben sem a közös jelátviteli utakra hat)
2. A hyperthyreosis az M_2 muszkarinerg rendszert is képes elnyomni
3. A c_x értékek alapján hyperthyreoid állapotban az ADA gátlás nagyobb interstitialis adenzin-szint emelkedést okoz
4. Az ADA gátlás hyperthyreosisban nagyobb mértékben növelheti az *ex vivo* szív adenozinerg védelmét

Köszönetnyilvánítás

- Köszönetemet fejezem ki Dr. Tósaki Árpád egyetemi tanárnak, a DE GYTK Gyógyszerhatástani Tanszék vezetőjének
- Köszönöm a segítséget Dr. Gesztelyi Rudolf adjunktusnak és Dr. Pák Krisztián PhD hallgatónak
- Támogatás:
 - Debreceni Egyetem
 - TÁMOP 4.2.4. A/1-11-1-2012-0001
 - TÁMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045

Köszönöm a figyelmet!



Önállóan végzett munka

- a kísérletre szánt tengerimalacok gondozása
- a műszerek beállítása
- a szervkádak kimosása, feltöltése
- oldatok készítése
- a vizsgált vegyületek oldatainak beadása, a hatás követése
- a regisztrátumok kiértékelése

Témavezetői segítséggel végzett munkák

- a tengerimalacok bal pitvarának kivétele és felfüggesztése a szervkádakban
- számítógépes adatfeldolgozás, ábrakészítés