

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**Kapszaicin-receptor (TRPV1) agonisták vaszkuláris biológiai
hatásai**

Czikora Ágnes

Témavezető: Dr. Tóth Attila



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2012

TARTALOMJEGYZÉK

1.	BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	6
1.1.	Az erek vaszkuláris biológiája	6
1.1.1.	Simaizomfunkciók	6
1.1.2.	Dilatatív hatások: endotél funkció.....	9
1.1.3.	Az érátmérő élettani szabályozása	11
1.2.	A TRPV1 receptor.....	14
1.2.1.	A TRPV1 élettani jelentősége	17
1.2.2.	A TRPV1 vaszkuláris expressziója és stimulációjának hatásai	18
1.2.3.	A TRPV1 farmakológiai jelentősége	20
1.3.	Az anandamid és hatásai	24
1.3.1.	Az anandamid szintézise és lebomlása.....	24
1.3.2.	Az anandamid, mint endovanilloid	27
1.3.3.	Az anandamid jelentősége.....	27
1.3.4.	Az anandamid vazóaktív hatásai	28
2.	CÉLKITŰZÉS.....	30
3.	METODIKÁK.....	31
3.1.	Kísérletes állatmodellek	31
3.2.	Izolált mikroértechnika	31
3.3.	A TRPV1 agonisták vizsgálata	33
3.4.	Az agonisták egyensúlyi állandójának meghatározása a vaszkuláris TRPV1-hez.....	34
3.5.	Intracelluláris Ca ²⁺ -koncentráció mérése az érátmérő változások mellett	34
3.6.	Simaizomsejtek izolálása és intracelluláris Ca ²⁺ -koncentráció változások mérése.....	35
3.7.	Eye-wiping teszt.....	36

3.8.	Az anandamid érátmérőre gyakorolt hatásainak vizsgálata	36
3.9.	Immunhisztokémia	38
3.10.	Statisztika	39
4.	EREDMÉNYEK.....	40
4.1.	A TRPV1 aktiváció által kiváltott vaszkuláris hatások.....	40
4.2.	A TRPV1 specifikus antagonistá AMG9810 hatásai	41
4.3.	A TRPV1-mediált konstriktió mechanizmusa.....	42
4.4.	A vaszkuláris TRPV1 farmakológiai tulajdonságainak vizsgálata	44
4.5.	A vaszkuláris és szenzoros neuronális TRPV1 populációk közötti különbségek	50
4.6.	Anandamid által kiváltott vazodilatáció.....	51
4.7.	Az anandamid hatásai az erek miogén tónusára.....	53
4.8.	Az endotél szerepe az anandamid által kiváltott vazodilatációban	54
4.9.	Az anandamid lebomlásának szerepe a dilatációban.....	56
4.10.	Funkcionális anandamid receptorok jelenlétének vizsgálata	56
4.11.	Az anandamid lebomlásából származó arachidonsav által kiváltott hatások vizsgálata ...	58
4.12.	FAAH expresszió a vázizomerekben	62
5.	MEGBESZÉLÉS	63
5.1.	A vaszkuláris TRPV1	63
5.2.	A kapszaicin kiváltott konstriktió specificitása	65
5.3.	Az anandamid vaszkuláris hatásai.....	68
6.	ÖSSZEFOGLALÁS	73
7.	SUMMARY	74
8.	IRODALOMJEGYZÉK	75
9.	TÁRGYSZAVAK	93
10.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	94
11.	FÜGGELÉK.....	95

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AA	arachidonsav
ABHD4	α/β -hidroláz 4
ANA	anandamid
ANOVA	varianciaanalízis (Analysis of Variance)
ATP	adenozin-trifoszfát
BSA	borjú szérum albumin
cAMP	ciklikus adenozin-monofoszfát
CaMKII	Ca ²⁺ /kalmodulin-függő kináz II
CaM	kalmodulin
CB1	1-es típusú kannabinoid receptor
CB2	2-es típusú kannabinoid receptor
cGMP	ciklikus guanozin-monofoszfát
CPI-17	17 kDa-os PKC-vel aktivált inhibitor
CGRP	kalcitonin gén-rokon peptid (Calcitonin gene-related peptide)
CHO-TRPV1	TRPV1-et expresszáló CHO sejtvonal
COX	ciklooxygenáz
DAG	diacil-glicerol
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EDCF	endotélsejt-eredetű (derived) kontrakciós (contraction) faktor
EDHF	endotélsejt-eredetű (derived) hiperpolarizáló faktor
EDRF	endotélsejt-eredetű (derived) relaxáló faktor
FAAH	zsírsav-amid hidroláz
GDE1	glicerofoszfo-diészteráz
20-HETE	20-hidroxi-eikozatetraénsav
HCN1	hiperpolarizáció által aktivált, ciklikus nukleotidok által szabályozott nem-szelektív kation csatorna
IP ₃	inozitol triszfoszfát
Kapsz	kapszaicin
LOX	lipoxigenáz
MLC	miozin könnyű-lánc (light chain)
MLCK	miozin könnyű-lánc kináz
MLCP	miozin könnyű-lánc foszfatáz
NAE	N-acil-etanolamin
NAPE	N-acil-foszfatidil-etanolaminok
NO	nitrogén-monoxid
NOS	nitrogén-monoxid szintáz
PBS	foszfáttal pufferolt sóoldat (phosphate-buffered saline)

PGI ₂	proosztaciklin
PIP2	foszfatidil-inozitol 4,5-biszfoszfát
PKA	cAMP dependens protein kináz A
PKC	protein kináz C
PLA ₂	foszfolipáz A ₂
PLC	foszfolipáz C
PTPN22	protein tirozin foszfatáz, nem receptor típusú 22
Rho/Rho kináz	Ras fehérjével homológiát mutató onkoprotein kináz
RT-PCR	reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció
RTX	reziniferatoxin
R-WIN	WIN55-212-2 (CB1 és CB2 agonista)
SHIP1	inozitol-5-foszfatáz-1
SNP	NO donor nitroprusszid-nátrium
SP	P anyag (Substance P)
THC	tetrahidrokannabinol
TRP	Tranziens Receptor Potenciál fehérje
TRPA	Tranziens Receptor Potenciál Ankirin alcsalád
TRPC	Tranziens Receptor Potenciál klasszikus/kanonikus alcsalád
TRPM	Tranziens Receptor Potenciál Melasztatin alcsalád
TRPP	Tranziens Receptor Potenciál Mukolipin 5 alcsalád
TRPV	Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid alcsalád
VRL	Vanilloid Receptor Like csatorna (TRPV2)

1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. Az erek vaszkuláris biológiája

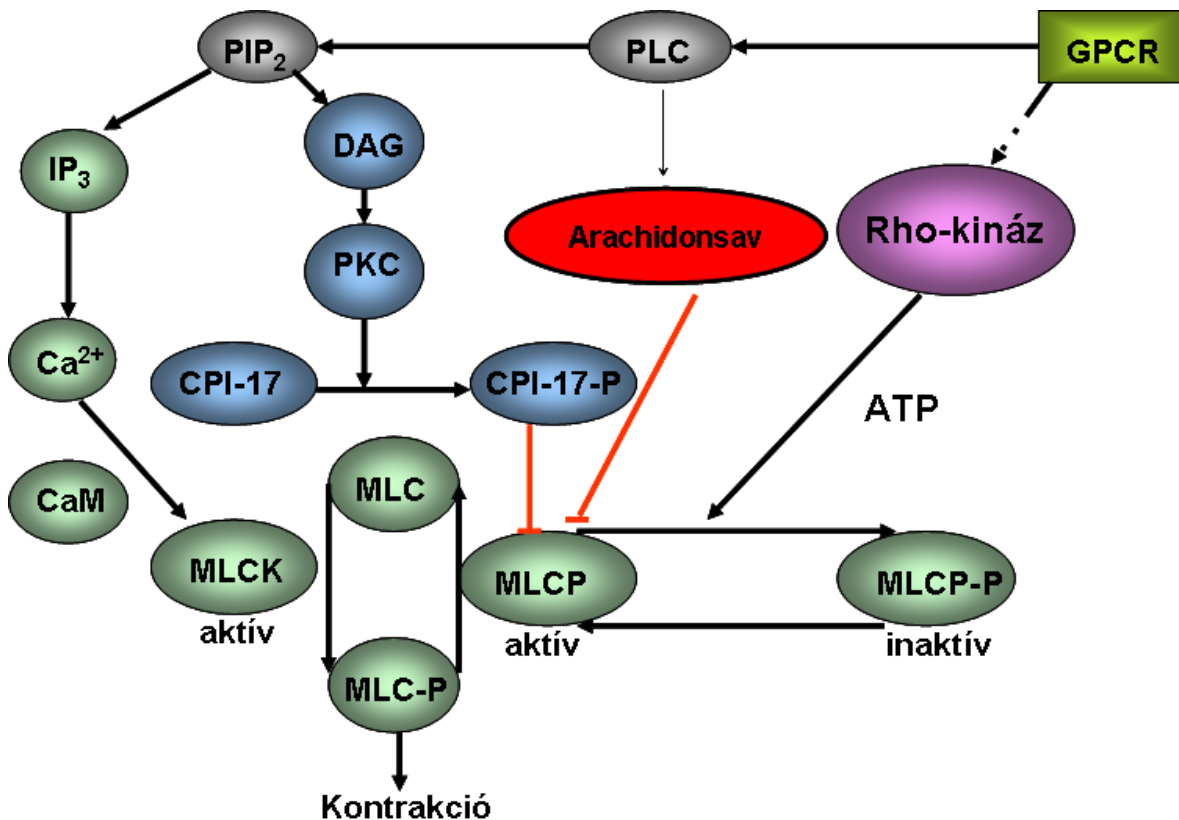
Az érszövet funkcionális sejtjei közül a simaizom- és endotélsejtek alapvető jelentőségűek. Az simaizmok az erek kontraktilis sejtjei, amelyek a vegetatív működések végrehajtó (effektor) sejtjei. Összehúzódásuk és elernyedésük által működésük alapvető szerepet játszik a vérkeringési rendszer szabályozásában. Az endotélsejtek a simaizomsejtek mellett az érfalak integritásának fenntartása és az erek homeosztázisának kialakítása mellett az erek dilatatív mechanizmusainak szabályozásában is részt vesznek.

1.1.1. Simaizomfunkciók

A miozin molekula egyik alegysége a 20 kDa molekulatömegű miozin könnyű-lánc (MLC). Nyugalmi állapotban az MLC fehérje foszforiláltsági szintje alacsony és gátolja a miozin-aktin kölcsönhatást, ami által nem alakul ki a kontrakcióhoz vezető aktin-miozin közötti kereszthíd-ciklus. Az összehúzódást kiváltó hatásokra (elsősorban az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció emelkedésére) az MLC foszforilálódik és konformációváltáson esik át, így a foszforilált MLC kevésbé akadályozza a miozin és az aktin közötti kereszthidak kialakulását. A MLC-ra specifikus miozin könnyű-lánc kináz (MLCK) katalizálja MLC enzimátikus foszforilációját, mely enzim aktivitása a mioplazma Ca^{2+} -koncentrációjának függvénye: a mioplazma Ca^{2+} -koncentrációjának emelkedése megindítja az összehúzódást. A Ca^{2+} hatását kalmodulinhoz kapcsolódva, mint Ca^{2+} -kalmodulin komplex fejt ki. Ez a komplex aktiválja a MLCK-t, ami ezután az MLC egy meghatározott szerin oldalláncát (Ser 19) foszforilálja (Allen és mtsai. 1994). Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció mellett

az MLCK aktivitása további szabályozás alatt is áll. Így például a protein-kináz A (PKA) általi foszforiláció az MLCK Ca^{2+} -érzékenységének csökkenésével jár.

Bár a simaizom-aktivitás legfontosabb mechanizmusa a Ca^{2+} jel, más, a Ca^{2+} jeltől részben független mechanizmusok is képesek simaizom-összehúzódást kiváltani. A miozin könnyű lánc foszfatáz (MLCP) aktivitásának csökkenése is ilyen Ca^{2+} -független összehúzódáshoz vezethet. Az erek simaizom összehúzódása tehát foszforiláció és defoszforiláció által szabályozott folyamat (1. ábra) (de Lanerolle és mtsai. 1991).



1. ábra. Simaizom kontrakció és a Ca^{2+} -érzékenyítés

A simaizom kontrakció elsődlegesen a miozin könnyű-lánc (MLC) foszforilációjának függvénye. Az intracelluláris Ca^{2+} -szint emelkedése fokozza a miozin könnyű lánc kináz (MLCK) aktivitását, ami az MLC foszforilációjához (MLC-P) és így kontrakcióhoz vezet. A kontrakció mértékének és időtartamának szabályozása a MLC-P-t defoszforiláló miozin foszfatáz (MLCP) aktivitásához kötődik. A defoszforiláció sebességének szabályozása az MLCP közvetlen gátlásával (CPI-17), illetve foszforilációja által (MLC-P) meghatározza az adott intracelluláris Ca^{2+} -szint mellett a kontrakció mértékét; az MLCP gátlása mellett megfigyelhető fokozott kontrakciót Ca^{2+} -érzékenyítésnek nevezzük.

A protein kináz C (PKC) aktiválása is szerepet játszhat a tartós simaizom-összehúzóásban. A PKC aktiválódásával járó jelátviteli útvonalak a simaizomokban lassan bekövetkező és tartós összehúzóáshoz vezetnek (Horowitz és mtsai. 1996). Ennek mechanizmusaként feltételezték, hogy a PKC foszforilálja a 17 kDa tömegű CPI-17-et, amely foszforilált formában gátolja a miozin foszfatázt (MLCP). *In vitro* számos kináz foszforilálja a CPI-17-t, de *in vivo* egyedül a PKC felelős ezért a foszforilációért (Eto és mtsai. 1995) (1. ábra). Korábbi tanulmányokban leírták, hogy a PKC farmakológiai gátlásának, illetve aktiválásának fontos szerepe van az arteriális miogén tónus szabályozásában (Hill és mtsai. 1990; Osol és mtsai. 1991; Hill és mtsai. 1996). A PKC inhibitorok a kanulált ereken dilatációt, a PKC aktivátorok konstriktiót váltottak ki a Ca^{2+} -koncentráció emelkedése nélkül (Hill és mtsai. 1990).

Kísérleteinkben a simaizomfunkció ellenőrzésére és a várható maximális konstriktió megítélésére a noradrenalint, a szimpatikus (adrenerg) idegrendszer ingerületátvivő anyagát használtuk. A noradrenalin által kiváltott válaszok az erek simaizmában található α receptorok aktivációjának következményei (Ahlquist 1948). Az α receptorok G-fehérjéket aktiválva foszfolipáz C (PLC) aktivitás fokozódásán keresztül mind az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció emelkedésén, mind a Ca^{2+} -érzékenyítésen keresztül vazokonstriktiót okoznak. Ezen utóbbi, Ca^{2+} -jeltől független mechanizmus (Ca^{2+} -érzékenyítés) során a PLC a membrán foszfatidil-kolinjából arachidonsavat szabadít fel, amely a miozin könnyű lánc foszfatázt gátolja; így a foszforilált MLC szintje emelkedik, és az izom összehúzódik (1. ábra) (Dimopoulos és mtsai. 2007).

A Ca^{2+} -érzékenyítés folyamatát a Rho/Rho kinázon alapuló mechanizmusokkal is magyarázzák (1. ábra). A Rho/Rho-kináz G-fehérjékhez kapcsolt útvonalainak szerepét Bolz és munkatársai rezisztenciaerek esetében írták le. Az általuk vizsgált kis vázizomerekekben az oxidált lipoproteinek fokozták a Rho és Rho-kináz aktivációját, ami

vazokonstrikciónhoz vezetett (Bolz és mtsai. 2000). A Rho-kináz egy szerin/treonin kináz, amely számos sejten belüli funkcióban játszik szerepet, mint amilyen a simaizom összehúzódás is. Fontos szerepet játszik a simaizom Ca^{2+} -érzékenyítésében és az értónus szabályozásában azáltal, hogy egyrészt foszforilálja a miozint, másrészt foszforilálja a miozin foszfatázt, amely a foszfatázaktivitás gátlását eredményezi. A Rho-kináz foszforilációval fokozza a CPI-17 fehérje miozin foszfatáz gátló képességét is, így a Rho-kináz-függő foszforiláció hozzájárulhat a miozin foszforilációs szintjének növeléséhez (Dimopoulos és mtsai. 2007).

1.1.2. Dilatatív hatások: endotél funkció

Az erek működésének szabályozásában nemcsak a simaizmok játszanak fontos szerepet, hanem az endotélsejtek is. A szervezet valamennyi erét endotélsejtek bélelik. Az 1980-as évektől kezdődően mutatták ki, hogy az endotélsejtekből különböző értágító és érszűkítő szabályozó molekulák szabadulnak fel. Ezeket a mediátorokat előbb endotélsejt-eredetű relaxáló faktorként (EDRF), illetve endotélsejt-eredetű kontrakciós faktorként (EDCF) említették. Az EDRF-et a továbbiakban, mint nitrogén-monoxidot (NO) azonosították (Furchgott és mtsai. 1980). A NO felszabadulását különböző extracelluláris jelzőmolekulákkal, mint például acetilkolinnal, továbbá az endotélsejt mechanikai deformálásával lehet kiváltani. Az endotélsejtekben a foszfolipáz A_2 (PLA₂) a membránlipidekből arachidonsavat tesz szabaddá. Az arachidonsav metabolikus útvonalakon keresztül alakul át különböző értágító hatású prosztanoidokká, mint amilyen a prosztaciklin (PGI₂). A PGI₂ az adenilát-cikláz aktiválásával lazítja el az érfal simaizmaeit. A rezisztenciaerek miogén válaszáért továbbá olyan arachidonsav metabolitok is felelősek lehetnek, mint például a 20-hidroxi-eikozatetraénsav (20-HETE) (Frisbee és mtsai. 2001).

Az acetilkolin a paraszimpatikus (kolinerg) idegrendszer ingerületátvivő anyaga, amely muszkarinos receptorokon fejtheti ki hatásait. Az általunk vizsgált erekben az acetilkolin vazodilatatív hatásainak háttérében az endoteliális sejtekben expresszálandó M3-as típusú muszkarinerg acetilkolin receptorok stimulációja áll (McCormack és mtsai. 1988). Stimulációjuk endotél-függő vazodilatációhoz vezet, mely jelenséget saját munkánkban az endotél épségének vizsgálatára használtunk fel.

Az acetilkolin által mediált hatások három útvonalon keresztül vezethetnek vazodilatációhoz. Az első mechanizmus az endotélium eredetű relaxáló faktorhoz köthető (Furchgott és mtsai. 1980). A második mechanizmus a PGI₂ szintéziséhez kötött (Gryglewski és mtsai. 1986). A harmadik mechanizmus az úgynevezett endotél-eredetű hiperpolarizáló factor (EDHF) által közvetített, amely NO és prosztaglandin szintézis gátlása mellett is megfigyelhető (Chen és mtsai. 1988). Ezen utóbbi faktor ugyan még nem azonosított, de annyi mindenképpen tudott róla, hogy (i) a simaizomsejtek hiperpolarizációjával jár; (ii) ez a hiperpolarizáció a simaizomsejtek Ca²⁺-aktivált K⁺-csatornák megnyílásának eredménye; (iii) ezért a faktor simaizomsejtekre kifejtett hatása mind az extracelluláris Ca²⁺-koncentráció emelésével, mind a K⁺-csatornák gátlásával felfüggeszthető.

Az erek ellazításában a polimodális afferens idegvégződéseknek is szerepük van. Fizikai és kémiai ártalmak hatására az intracelluláris Ca²⁺-koncentráció emelkedése az idegvégződésekben található neurotranszmittereket tartalmazó vezikulák kiürüléséhez vezet. Az ilyen mechanizmusok által létrejövő vazodilatációban jelenleg három neuropeptidnek, a P-anyagnak (SP), a calcitonin gén-rokon peptidnek (CGRP), továbbá a neurokinin A-nak tulajdonítunk szerepet. Úgy tűnik, hogy a három neuropeptid közül a 37 aminosavból álló CGRP-nek tulajdonítanak (Amara és mtsai. 1982) a legfontosabb szerepet, mely fokozza az adenilát-cikláz aktivitását, ugyanis hatására intracellulárisan

megnő a cAMP mennyisége. A megnövekedett cAMP-szint aktiválja a PKA enzimet, majd ezt követően megnyílnak az ATP-függő K^+ -csatornák. A folyamat eredménye az érfali simaizom relaxációja és az erőteljes értágulat (Edvinsson és mtsai. 1985; Han és mtsai. 1990; Hughes és mtsai. 1994). A CGRP érpermeabilitást fokozó hatását nem közvetlenül, hanem a SP hatásának potencírozásával fejt ki (Cao és mtsai. 2000).

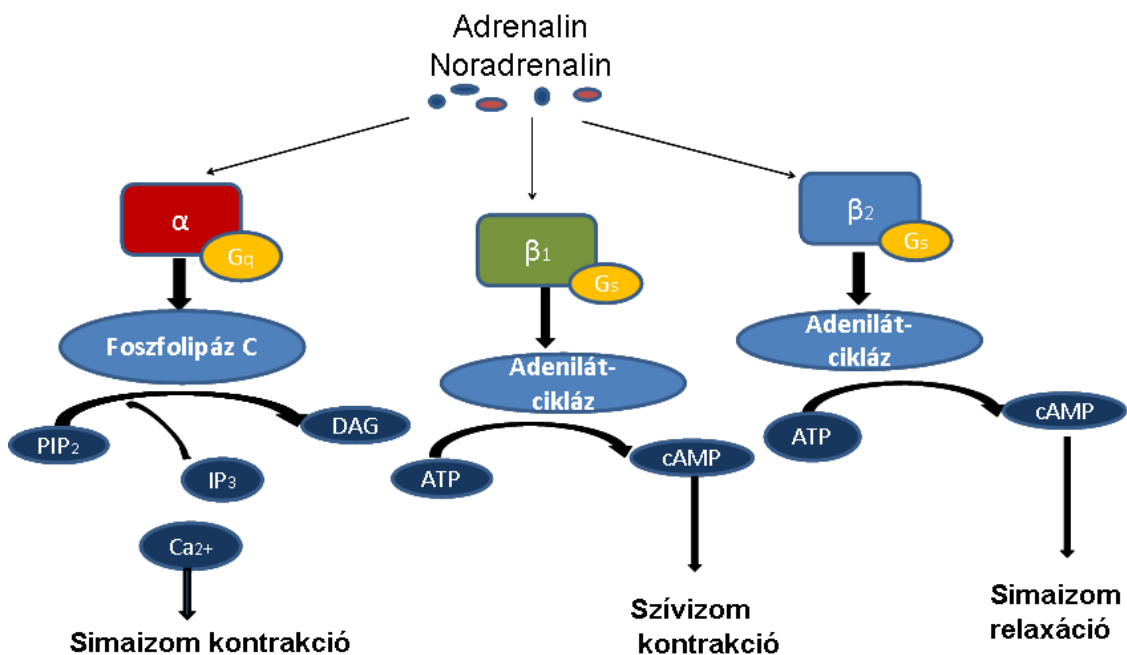
1.1.3. Az érátmérő élettani szabályozása

Rugalmas tulajdonságaik, falvastagságuk, adaptív készségük (compliance) és az izomelemek alapján a vérkeringési rendszer ereit feloszthatjuk a legnagyobb méretű elasztikus artériákra, vezető (konduktív) funkciójú muszkuláris artériákra, rezisztenciaerekre, kicserélési erekre, kapilláris erekre, valamint a kisebb és nagyobb vénákra. Az elasztikus falú artériák mérsékelik a nagyerekben a nyomásingadozások amplitúdóját, és hozzájárulnak az artériás rendszerekben az áramlás folyamatosságához. Az elasztikus artériákat követő artériáknak vezető (konduktív) funkciójuk van. A konduktív artériákat követő kis artériákat és arteriolákat prekapilláris rezisztenciaereknek nevezzük, melyek jelen kísérleteink szempontjából a legfontosabbak. Ezen erek átmérőjének aránylag kismértékű változása is jelentősen módosítja a véráramlást; az összehúzódás csökkenti, míg az ellazulás növeli az érátmérőt. A rezisztenciaereknek kettős funkciójuk van: (i) mindenkori állapotuk az egyik meghatározója a nagyvérköri artériás nyomásnak, (ii) lokálisan szabályozzák az utánuk következő érszakasz, a mikrocirkulációs terület véráramlását; tágulatuk fokozza a helyi áramlást és a kapillárisokban uralkodó nyomást, összehúzódásuk csökkenti a helyi áramlást és a kapilláris nyomást (Fonyó Attila, Orvosi élettan).

Az artériák alapvető tulajdonsága, hogy az intraluminális nyomás emelkedésére konstriktóval, míg a nyomás csökkenésére dilatációval reagálnak (miogén válasz). Ezt a jelenséget W. M. Bayliss eredetileg 1902-ben jegyezte le (Bayliss 1902). Ezen miogén válasz jelentős olyan rezisztenciaerekben, mint például a vázizom arteriolák. A rezisztenciaerek simaizomsejtjei tehát nyugalmi állapotban nincsenek teljesen relaxált állapotban, hanem rendelkeznek egy belső (intrinsic) aktivitással, amely független a vérér beidegzésétől és a hormonális hatásoktól. Ez a kontrakció fenntart egy bizonyos mértékű vazokonstriktó, amelyet bazális tónusnak nevezünk (Folkow 1989).

A kardiovaszkuláris rendszer csak igen ritkán működhet valódi nyugalmi körülmények között. Állandó változásoknak van kitéve, ezért az érfali simaizom működését idegi és humorális impulzusok is szabályozzák, ugyanis szimpatikus beidegzés nélkül a rezisztenciaerek bazális tónusa nem elégséges az artériás vérnyomás megfelelő szinttartásához. Ezek a szimpatikus rostok folyamatos aktivitással rendelkeznek, így folyamatosan stimulálják az erek falában elhelyezkedő simaizom sejteket. Ezen stimuláció következménye szintén egy bizonyos mértékű vazokonstriktó, amelyet nyugalmi vazokonstriktor tónusnak nevezünk. Az egyes érszakaszok szimpatikus beidegzésének sűrűsége rendkívül különböző: a legnagyobb beidegzési sűrűség az artériák szakaszán található, míg az aortában és a nagy artériákban a beidegzés igen kicsi. Ennek megfelelően a nyugalmi vazokonstriktor tónus az agy és vese ereiben kisebb, mint a bőr és a splanchnikus területek ereiben. Az erekhez futó szimpatikus rostok végződéseinek fő neurotranszmittere a noradrenalin. A szimpatikus noradrenerg érszűkítő hatás a simaizomsejteken lévő α_1 -receptorokon keresztül érvényesül (Ahlquist 1948). Az α_1 -adrenerg receptor G_q fehérjéhez kapcsolt, ami az inozitol-triszfoszfáton (IP_3) keresztül növeli a Ca^{2+} -koncentrációt, ami simaizomösszehúzódot eredményez. Az α_1 -receptornak fontos szerepe van a nyugalmi vazokonstriktor tónus kialakításában. A miogén tónus

szabályozásában az α receptorok mellett a β -adrenerg receptorok is szerepet játszanak. A G_s fehérjéhez kapcsolt β -adrenerg receptorok aktivációja stimulálja az adenilát-cikláz, megnövelve a sejten belüli cAMP-szintet. A cAMP fokozza a PKA aktivitását mely foszforilálja a simaizom kontrakcióját szabályozó Ca^{2+} -kalmodulin dependens miozinkönyülánc-kinázt (MLCK). Az MLCK foszforilált formája kevésbé aktív, így a kontrakció mértéke csökken és az érintett érterületen értágulat jön létre. A β -receptorok megoszlása az egyes párhuzamos érterületek ereiben nem egyenletes: β_2 -receptorok vannak a váz- és a szívizom legkisebb artériáiban és arterioláiban, a májban, vesében, tüdőben, valamint a bélben, máshol azonban hiányoznak. Ugyanakkor a szívizomzatban főként β_1 -receptorok expresszálódnak, melyek stimulációja révén fokozódik a szívösszehúzódások ereje (2. ábra).



2. ábra. Az adrenerg receptorok felosztása és az általuk közvetített hatások

Az adrenerg receptorok számos keringést érintő hatásokat közvetíthetnek. Az α -receptorok simaizomsejteken a G_q aktiválódását okozva kontrakcióhoz vezetnek. A β -receptorok stimulációja G_s fehérje aktivációja által szívizomsejteken (β_1) kontrakciót, simaizomsejteken (β_2) relaxációt vált ki.

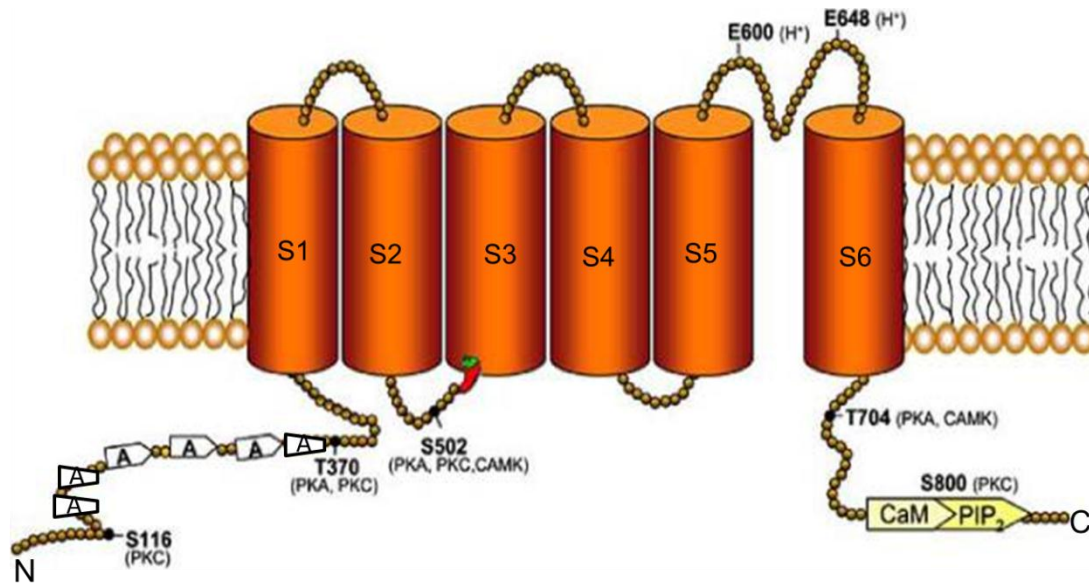
A koronáriák nyugalmi tónusa magas, amely nagy részben miogén eredetű (Liu és mtsai. 2009). A koronáriaerekben α_1 - és β_2 -adrenerg-receptorok is megtalálhatóak. Az α receptorok stimulációja konstrikciónak (Kitazawa és mtsai. 2012), míg a β receptorok stimulációja relaxációnak vezet (Laughlin és mtsai. 2012). Általánosságban elmondható, hogy a koronária erekben a β receptorok által mediált relaxációs hatások dominálnak. Ezzel szemben például vázizom arteriolákban ugyanolyan koncentrációjú noradrenalin stimuláció esetében az α receptorok által mediált vazokonstrikciónak a döntő jelenség. A β_2 -adrenerg-receptorok expresszálódhatnak koronáriákban és a vázizmot ellátó erekben is. Jelentős különbség ugyanakkor, hogy az általunk vizsgált erek esetében a koronáriákban a noradrenalin dilatációt okozott, ami az α receptorokhoz köthető útvonalak kisebb jelentőségére utal, míg a vázizomerekben a noradrenalin vazokonstrikciónak okozott, ami az α receptorok dominanciájára utalt.

1.2. A TRPV1 receptor

A TRPV1 egy nem szelektív kationcsatorna ($P_{Ca}/P_{Na} \leq 10$). A TRPV1 azonosítása kapszaicin érzékenysége alapján történt, amikor kapszaicin receptorként azonosították 1997-ben (Caterina és mtsai. 1997). Strukturális sajátosságai alapján a kapszaicin receptor homológiát mutatott a *Drosophila melanogaster* retinájában található TRP (tranzient receptor potential) fehérjével (Minke 2010), a kapszaicin receptor így a TRP receptor család egyik altípusának tekinthető, ezért a szakirodalomban TRPV1-nek (tranzient receptor potential vanilloid-1) nevezik. A transzient receptor potenciál (TRP) szuperfamiliának körülbelül 28 tagja van emlősökben. Ezek 6 alcsoportba oszthatóak úgy, mint ankirin (TRPA), kanonikus (TRPC), melasztatin (TRPM), policisztin (TRPP), mukolipin (TRPML) és vanilloid receptorok. A TRPV1 a TRPV alcsoport ismert első tagja,

napjainkig azonban még további 5 csatornát soroltak ebbe a családba (TRPV2-6). A család jelenleg ismert hat tagja közül négy (TRPV1-4) hőre is érzékeny kationcsatorna, melyek hőmérsékleti/aktiválhatósági tartománya részleges átfedést mutat. A TRPV1-től mind strukturálisan, mind aktivációs mechanizmusában a leginkább különböző csoportot a TRPV5-6 alkotják (Gunthorpe és mtsai. 2002; Pedersen és mtsai. 2005). A TRPV5 és a TRPV6 a kalcium abszorpcióban/reabszorpcióban működik közre vese és duodenum epitéliumban. Érdekes, hogy a TRPV család többi tagjára (TRPV2-6) nem hatnak olyan vanilloid struktúrájú vegyületek, mint a kapszaicin és a reziniferatoxin (RTX).

A később klónozott emberi TRPV1 receptor 92%-os hasonlóságot mutat a patkány receptor szerkezetével (Hayes és mtsai. 2000; McIntyre és mtsai. 2001). Ez a receptor 838 aminosavból álló, 95 kDa nagyságú fehérje, amit 6 β -redő szerkezetű transzmembrán domén épít fel, ahol az ötödik és hatodik transzmembrán domén között egy rövid, pórust formáló hidrofób hurok található. Mint a legtöbb TRP csatorna esetében, a TRPV1 receptorhoz is tartozik egy hosszú N-terminális régió, amely prolinban gazdag régiót és hat ismétlődő ankirin domént is tartalmaz, melyek potenciális PKA foszforilációs helyek (Caterina és mtsai. 1997; Kedei és mtsai. 2001). A receptor hatodik transzmembrán doménjéhez közel található egy C terminális régió is. Mind a C-, mind az N-terminális régió intracellulárisan helyezkedik el. Az ankirin régióknak szerepük lehet számos, a citoszólban található fehérje kötésében, mint amilyen a kalmodulin (CaM) is (Tominaga és mtsai. 2005), amelynek fontos szerepe van a receptor Ca^{2+} -függő deszenzitizációjában.



3. ábra. A TRPV1 szerkezete

A TRPV1-et 6 transzmembrán domén építi fel (S1-S6), ahol az ötödik (S5) és hatodik (S6) transzmembrán domén között egy rövid, pórust formáló hidrofób hurok található. A receptorhoz tartozik egy hosszú N- és egy C-terminális régió. Az N-terminális régió prolinban gazdag régiót, hat ismétlődő ankirin domént és számos foszforilációs helyet is tartalmaz.

A sok sejtben homotetramerként előforduló TRPV1 szabályozásában résztvevő kitüntetett aminosav csoportokat deléciókkal, pontmutációkkal határozták meg. A kapszaicin a második és harmadik transzmembrán doménhez a csatorna lipid felületén kötődhet, míg más vanilloid molekulák a csatorna citoszól felőli oldalán.

A receptor foszforilációjában fontos szerepet játszhat a PKC (Numazaki és mtsai. 2002; Bhave és mtsai. 2003; Mandadi és mtsai. 2004; Mandadi és mtsai. 2006), a cAMP függő PKA (Bhave és mtsai. 2002; Mohapatra és mtsai. 2003), és a Ca²⁺/kaldmodulin-függő kináz II (CaMKII) (Jung és mtsai. 2004). A foszforiláció szenzitizálja a TRPV1-et, növekszik a sejteken belüli Ca²⁺-szint is, és ezzel egyidejűleg a receptor aktivitása csökken (deszenzitizáció). Ez alatt az akut deszenzitizációs periódus alatt a receptor aktivitását a reverzibilis foszforiláció szabályozza. A defoszforiláció a TRPV1-et deszenzitizálja, az intracelluláris Ca²⁺-koncentrációt pedig alacsony szinten tartja. Ebben az akut deszenzitizációban főleg a protein foszfatáz 2B (calcineurin) (Docherty és mtsai. 1996; Mohapatra és mtsai. 2005) szerepét igazolták, mely enzim képes a TRPV1-et

defoszforilálni. Kutatócsoportunk korábbi eredményei arra utalnak, hogy a vaszkuláris TRPV1 aktivációjában is fontos szerepet játszik a PKC általi foszforiláció, illetve a defoszforilációért felelős kalcineurin gátlása (Lizanecz és mtsai. 2006) is.

A TRPV1 akut deszenzitizációjának hátterében a defoszforiláción kívül további folyamatok jelentőségét is igazolták különböző sejtvonalakban. Ilyen folyamat a csatorna kapuzásának feszültség-függésének változása (Piper és mtsai. 1999; Gunthorpe és mtsai. 2000); a kapszaicin kötőhelyek számának csökkenése (Jung és mtsai. 2004); valamint a foszfatidil-inozitol 4,5 biszfoszfát (PIP₂) disszociációja a receptorról (Liu és mtsai. 2005).

1.2.1. A TRPV1 élettani jelentősége

A TRPV1 megtalálható a szenzoros C és A- δ neuronokban (Caterina és mtsai. 1997). Ezzel összhangban egyik élettani szerepe a fájdalmas ingerek érzékelése, amit fizikai és kémiai hatások, mint az alacsony pH, magas hőmérséklet, extracelluláris ozmolaritás- és nyomásváltozások, irritatív anyagok, mint a paprika csípős ízét adó kapszaicin és tágabb értelemben a vanilloidok váltanak ki (Szallasi és mtsai. 1999; Di Marzo és mtsai. 2002; Di Marzo és mtsai. 2002; Ross 2003).

A szenzoros idegek végződéseiben expresszáldó TRPV1 aktivációja Ca²⁺ és Na⁺ ionok sejtekbe történő beáramlásával jár. Az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció emelkedése a perifériás TRPV1 aktivációja esetén helyi, úgynevezett „szenzoros efferens” hatásokhoz vezet (Szolcsanyi 1988). A folyamat során az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció emelkedése az idegvégződésekben található neurotranszmittereket (CGRP és a SP) tartalmazó vezikulák kiürüléséhez vezet. Ezen neurotranszmitterek az erek endotéliájához diffundálnak és a sejt felszíni receptorokhoz kötődve aktiválják az endoteliális nitrogén-monoxid szintáz (NOS) (Zygmunt és mtsai. 1999). A képződő NO a simaizom sejtekben a szolubilis

guanilát cikláz aktiválásával emelkedett cGMP szinthez és ezen keresztül relaxációhoz vezet. A TRPV1 közvetített vazodilatáció tehát endotél és NO szintézis függő. A vazodilatáció különböző vérerekben figyelhető meg, mint a mezenteriális, hepatikus, baziláris, durális és meningeális artériákban (Zygmunt és mtsai. 1999; Ralevic és mtsai. 2001; Harris és mtsai. 2002; Dux és mtsai. 2003; Akerman és mtsai. 2004; O'Sullivan és mtsai. 2004).

A TRPV1 expresszió tekintetében az utóbbi években meglepő eredmények születtek, melyek arra utalnak, hogy a TRPV1 korántsem csak a szenzoros neuronokban expresszálódik. Így kimutatták a TRPV1 jelenlétét a központi idegrendszer számos sejttípusában (neuronok, asztrociták, periciták) (Mezey és mtsai. 2000; Toth és mtsai. 2005). Egyre több információ lát arról is napvilágot, hogy ezen nem szenzoros neuronokban expresszálódó TRPV1 funkcionális jelentőséggel bírhat. Immunhisztokémiai vizsgálatok segítségével kimutatták humán bőr epidermiszén és tenyésztett epidermális keratinocitákon, amit RT-PCR módszerrel is alátámasztottak (Denda és mtsai. 2001; Inoue és mtsai. 2002). Ezt követően beszámoltak arról, hogy a keratinociták a receptor funkcionális formáját expresszálják. További vizsgálatok rámutattak arra, hogy az epidermális keratinocitákon megtalálható TRPV1 szerepet játszhat a bőr gyulladásozó folyamatainak kialakításában, illetve szabályozásában. A receptor farmakológiai befolyásolása pedig különböző bőrbetegségek kezelésében lehet fontos (Biro és mtsai. 1997; Paus és mtsai. 2006; Biro és mtsai. 2007; Moran és mtsai. 2011).

1.2.2. A TRPV1 vaszkuláris expressziója és stimulációjának hatásai

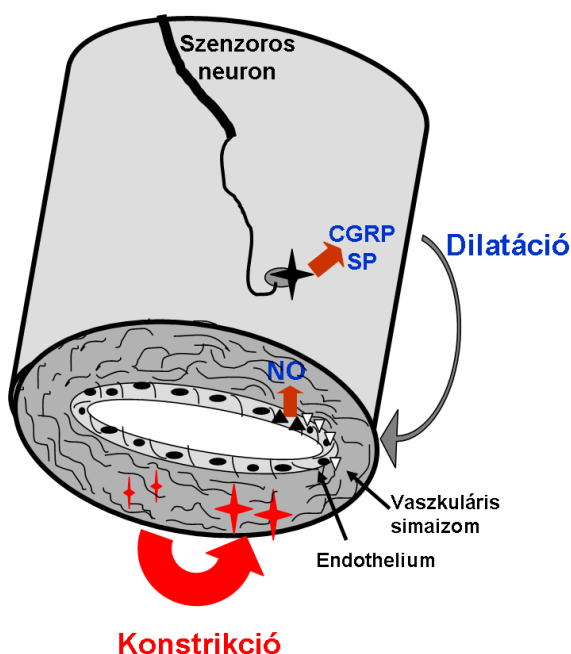
Korábbi eredményeink szerint a TRPV1 expresszálódhat a vaszkuláris szövetekben is. Azt találtuk, hogy a TRPV1 stimuláció a patkány bőrben vazodilatációt váltott ki, míg az izomban vazokonstriktiót (Kark és mtsai. 2008). A vazokonstriktív mechanizmusok

vizsgálata során megerősítettük a vaszkuláris TRPV1 jelenlétét az erek simaizom rétegében, ami a receptor kapszaicin iránti érzékenységének sejtspecifikusságára utal. Mindezekből arra következtetünk, hogy a vázizomerek simaizom rétegében expresszáldó TRPV1 szerepet játszik a rezisztenciaerek átmérőjének szabályozásában. A TRPV1 stimuláció gyakran okoz ellentétes vazoaktív hatásokat ugyanazon értípusban is. Így például mezenteriális erek esetében egyaránt leírtak vazokonstriktív (Scotland és mtsai. 2004) és vazodilatációt (Ralevic és mtsai. 2001). Ezen bifázisos hatásokat izolált vázizomerek esetében is megfigyelték (Kark és mtsai. 2008). Mindezek alapján felmerül annak lehetősége, hogy az érátmérő szabályozásában két ellentétes hatású TRPV1 populáció vesz részt: ugyanazon éren belül a vaszkuláris innerváció vazodilatatív hatásokat, míg a simaizomban található receptorok vazokonstriktív hatásokat közvetítenek (Lizanecz és mtsai. 2006). A kapszaicin alacsony koncentrációban dilatációt, magasabb koncentrációban pedig vazokonstriktív hatást okozott vázizomerekben (Kark és mtsai. 2008). A kifejlődő válasz ezen kettős hatás eredménye (4. ábra).

vazokonstriktív hatásokat számos értípus esetében már évtizedekkel ezelőtt is leírták (Molnar és mtsai. 1967; Toda és mtsai. 1972; Donnerer és mtsai. 1982; Duckles 1986; Edvinsson és mtsai. 1990). Vazokonstriktív hatás volt megfigyelhető kutya mezenteriális (Porszasz és mtsai. 2002), koronária (Szolcsanyi és mtsai. 2001), vázizom (Lizanecz és mtsai. 2006) és durális (Dux és mtsai. 2003) erekben is.

A kapszaicin kiváltotta *in vivo* vazokonstriktív hatásokat számos értípus esetében már évtizedekkel ezelőtt is leírták (Molnar és mtsai. 1967; Toda és mtsai. 1972; Donnerer és mtsai. 1982; Edvinsson és mtsai. 1985; Duckles 1986). Vazokonstriktív hatás volt megfigyelhető kutya mezenteriális (Porszasz és mtsai. 2002), koronária (Szolcsanyi és mtsai. 2001), vázizom (Lizanecz és mtsai. 2006) és durális (Dux és mtsai. 2003) erekben is. A megfigyelt konstrikció mechanizmusára több lehetséges mechanizmust javasoltak.

Ennek alapján felmerült a TRPV1 stimulációt követő, vazokonstriktív anyagok (endotelin, illetve SP) felszabadulása (Szolcsanyi és mtsai. 2001; Scotland és mtsai. 2004), illetve pontosabban nem karakterizált simaizom függő folyamatok aktivációja (Porszasz és mtsai. 2002; Dux és mtsai. 2003). Saját eredményeink viszont arra utalnak, hogy a TRPV1 funkcionálisan expresszálódik a vázizomerekben és aktivációja szenzoros neuronoktól függetlenül vezethet vazokonstriktióhoz (4. ábra) (Kark és mtsai. 2008).



4. ábra. A TRPV1 mediált vasoaktív hatások (Kark és mtsai. 2008)

A TRPV1 aktivációja által kiváltott dilatációban fontos szerepet kapnak a szenzoros neuronok és a végződéseikből felszabaduló neurotranszmitterek (CGRP, SP), ezen vazodilatáció endotél-függő. A TRPV1 funkcionálisan expresszálódhat ugyanakkor a vázizomerek simaizom rétegében is, és aktivációja közvetlenül vezethet intracelluláris Ca^{2+} -szintemelkedéshez és vazokonstriktióhoz.

1.2.3. A TRPV1 farmakológiai jelentősége

A TRPV1 a fájdalomérzet kialakulásában játszott szerepe miatt a gyógyszergyári kutatások homlokterébe került, amit az a tény is jelez, hogy napjainkig több mint 1000

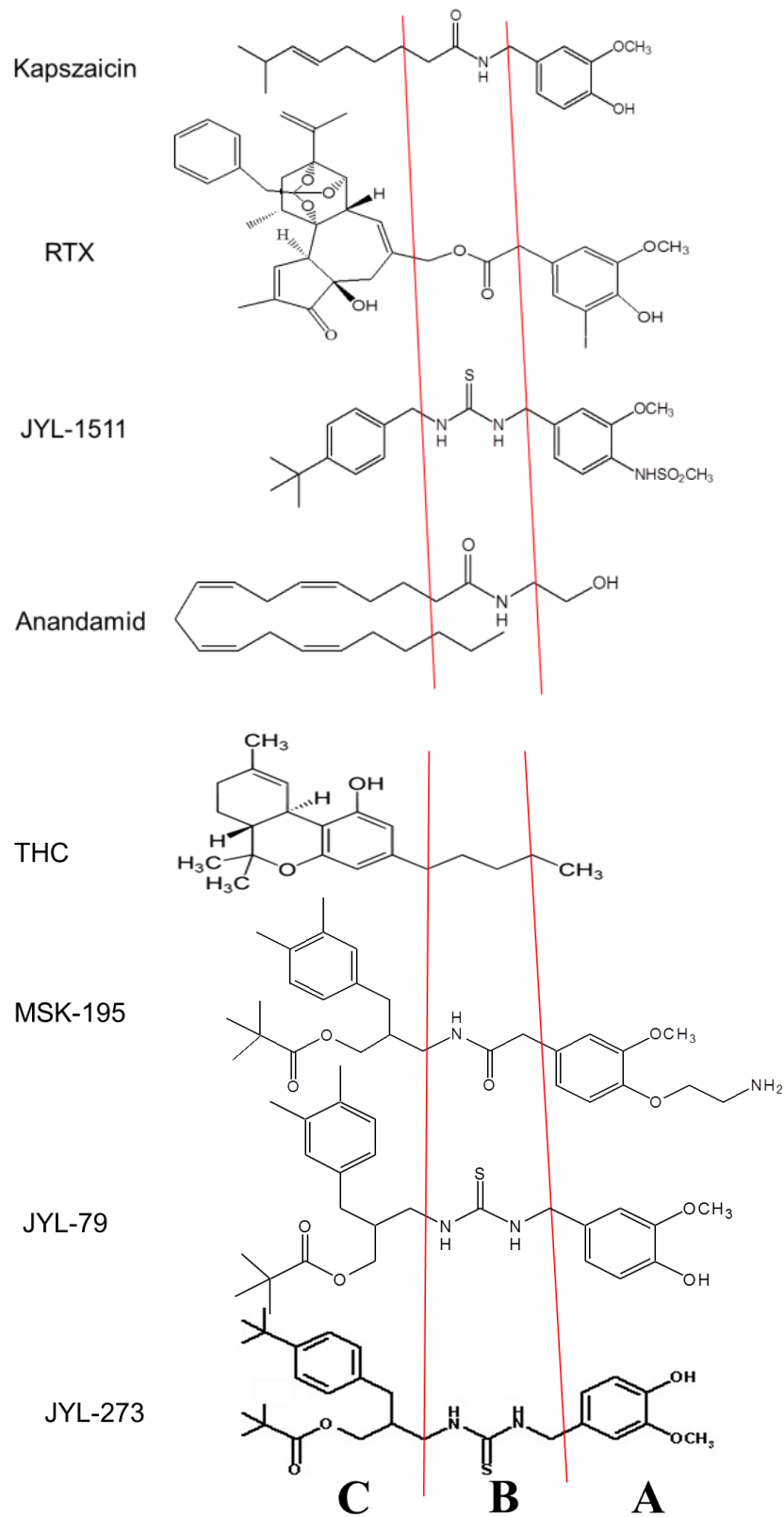
szabadalmat jegyezték be ebben a vonatkozásban. A TRPV1 gátlása klinikai I és II fázisú vizsgálatok szintjére jutott a krónikus gyulladásoos fájdalom és a migrén kezelésében (Szallasi és mtsai. 2007). Emellett más fájdalomtípusokban is feltételezik a TRPV1 antagonisták alkalmazhatóságát, mint a krónikus meghatározhatatlan okú fájdalom, mely rákos megbetegedésekben, AIDS, cukorbetegség és herpesz fertőzés után visszamaradó neuropátiás fájdalom mellett fordul elő. A fájdalomcsökkentő hatása mellett az is nyilvánvaló, hogy a TRPV1 gátlása terápiás jelentőségű lehet az inkontinencia és a krónikus köhögés esetében is (Szallasi és mtsai. 2007). A TRPV1-gátlás fájdalomcsillapító hatását TRPV1 knockout egérmodellekben kapott eredmények is alátámasztják (Caterina és mtsai. 2000; Davis és mtsai. 2000). Amellett, hogy a TRPV1 antagonisták mind állatmodellekben, mind klinikai vizsgálatokban sikeresnek bizonyultak, bizonyos TRPV1 antagonisták alkalmazása komoly hipertermiát okozott (Gavva és mtsai. 2008). A hipertermia kialakulásának hátterében valószínűleg a TRPV1 hőmérséklet szabályozásban betöltött szerepe állhat (Gavva és mtsai. 2007). Ugyanakkor az a tény, hogy nem minden fájdalom csökkentésére alkalmas TRPV1 antagonistá okozott hipertermiát (Khairatkar-Joshi és mtsai. 2009) arra utal, hogy a TRPV1 fájdalom kialakításban és hőszabályozásban fontos régiói farmakológiailag megkülönböztethetőek.

A TRPV1 receptor legismertebb antagonistája a kapszazepin, amely nem szelektív, mivel képes gátolni a feszültségfüggő Na^+ -, K^+ - és Ca^{2+} -csatornákat (Ray és mtsai. 2003), továbbá a humán HCN1 csatornát is (Gill és mtsai. 2004). Saját tanulmányunkban az AMG9810 antagonistát alkalmaztuk, mellyel Gavva és munkatársai foglalkoztak részletesen (Gavva és mtsai. 2005). Kísérleteikben igazolták ezen vegyület hatásait patkány és humán TRPV1 receptorokra, illetve kompetitív antagonizmust írtak le. Ugyanebben a tanulmányban tárták fel, hogy különbség lehet az antagonizmusban savas

pH-ra, hőre, vagy kapszaicinre létrejövő receptorális aktiváció esetén, valamint különbség mutatkozhat a humán és patkány receptorok gátlása között is (Gavva és mtsai. 2005).

A kapszaicin kémiai szerkezetét (Szallasi és mtsai. 1999) tekintve három régióra osztható (5. ábra). Úgy tűnik, hogy a vanillil csoportot is tartalmazó „A” régió a TRPV1 aktivitásának modulálásában fontos szereppel bír; kis módosításával lehet agonista és antagonistá molekulákat szintetizálni a TRPV1 kötőképesség jelentős befolyásolása nélkül (Lee és mtsai. 2003). A „B” és „C” régiók legfontosabb szerepe az „A” régió optimális orientációja és a vegyületek membránokhoz kötése, így módosításuk jelentősen érinti a TRPV1-hez való kötődésüket (Lee és mtsai. 2004).

Az ultrapotens TRPV1 agonista RTX (5. ábra) szerkezete ugyanakkor rámutatott, hogy a „C” régióban is lehetnek további TRPV1 kötőhelyek, melyek megfelelő konformáció esetében (például a RTX szerkezetében) a TRPV1-hez való affinitást akár három nagyságrenddel is növelhetik. Ezen tulajdonság kiaknázását RTX-szerű szerkezetek „C” régióba történő beépítésével kísérelték meg (Lee és mtsai. 2004; Lee és mtsai. 2004).



5. ábra. A TRPV1 agonisták szerkezete

Számos TRPV1 agonista esetében megfigyelhető a kapszaicin három funkcionálisan is fontos szerkezeti elemének megjelenése. Az "A" régió tartalmazza a vanillil csoportot, a "B" régió kapcsolatot teremt az "A" és a lipofób "C" régió között. A lipofób "C" régió szerkezete lehet egyszerű (kapszaicin, anandamid), de lehet a RTX-hoz hasonlóan összetett. A THC a resiniferatoxin-nal mutatott szerkezeti hasonlósága miatt került bemutatásra.

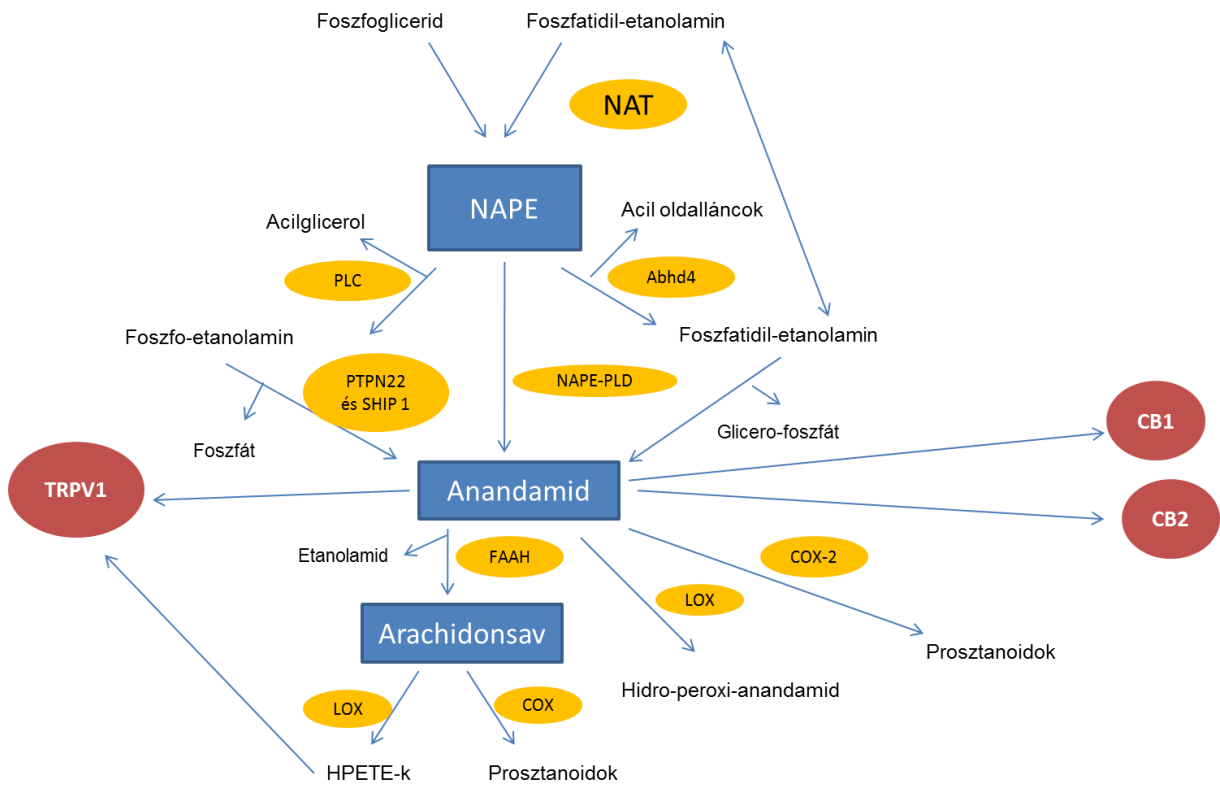
1.3. Az anandamid és hatásai

Az anandamidot 20 éve olyan agyi molekulaként azonosították, amely képes a kannabinoid receptorokhoz kötődni (Devane és mtsai. 1992). Az anandamid (N-arachidonil-etanolamin) (Devane és mtsai. 1992) mellett a másodikként leírt 2-arachidonil-glicerin (2-AG) (Mechoulam és mtsai. 1995) a legismertebb endogén kannabinoid molekula. Rajtuk kívül számos, a klasszikus kannabinoid receptorokon ható, illetve az endokannabinoidokkal kémiai rokon bioaktív lipidet sikerült azonosítani az agyban úgymint a virodamint (Porter és mtsai. 2002), a 2-arachidonil-glicerin-étert (noladin-étert) (Hanus és mtsai. 2001), az N-arachidonil-dopamint (NADA-t) (Bisogno és mtsai. 2000) és az N-arachidonil-szerint (Milman és mtsai. 2006). Későbbi azt is kimutatták, hogy az anandamid nemcsak a kannabinoid receptorokat (CB1 és CB2), hanem a TRPV1-et is aktiválja (Zygmunt és mtsai. 1999), és számos más fehérje aktivitását is befolyásolja (Alexander és mtsai. 2007) (6. ábra). Hatékonyságát tekintve azonban jelentős különbségeket találtak, egyes kísérleti rendszerekben teljes, míg másokban részleges agonistának bizonyult így a TRPV1 esetében is (Toth és mtsai. 2009).

1.3.1. Az anandamid szintézise és lebomlása

Az anandamid kémiai etanolamin arachidonsavval képzett amidja, felépítése alapján tehát az N-acil-etanolaminok (NAE) családjába tartozik. Az N-acil-etanolaminok közé tartozó molekulák esetében a szintézisben és a lebomlásban részt vevő enzimek gyakran képesek rokon szerkezetű molekulák átalakítására is (Di Marzo és mtsai. 1994; Cravatt és mtsai. 1996). Az anandamid a membránokban jelen lévő N-acil-foszfatidil-etanolaminok (NAPE) (Di Marzo és mtsai. 1994) hidrolízisével keletkezik egy specifikus foszfolipáz D (NAPE-PLD) segítségével (Okamoto és mtsai. 2004). A NAPE-PLD által

közvetített, hagyományos szintézis-útvonal mellett az anandamid két új lehetséges anabolikus útvonalát is azonosították. Az egyik az ABHD4-GDE1 kaszkád, ahol az α/β -hidroláz 4 (ABHD4) egy NAPE-kra specifikus lizo-foszfo-lipáz, a NAPE-k *sn*-1-es és *sn*-2-es pozíciójában lévő acil-csoportok egymást követő bontásán keresztül katalizálja a glicerofoszfo-NAE-k keletkezését, melyeket egy fémion-függő glicerofoszfo-diészteráz (GDE1) hidrolizál NAE-kra és glicerín-3-foszfátra (Simon és mtsai. 2006). A másik útvonal pedig a NAPE-k foszfolipáz C (NAPE-PLC) által mediált hidrolízisének termékéből, a foszfo-NAE-kból alakít át NAE-kat (Liu és mtsai. 2008) (6. ábra).



6. ábra. Az anandamid metabolizmusa

Az anandamid képződés jelentős lépése az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció emelkedése, mely az N-acil-foszfatidil etanolamid (NAPE) átalakulását katalizáló foszfolipáz (PLD) aktivitását fokozza. A keletkező anandamid a sejtmembránokon átjutva a szomszédos sejtekbe jut, ahol sejtfelszíni receptorokat (CB1, CB2, TRPV1) aktiválhat, illetve a citoplazmába juthat. Az anandamid lebontását a zsírsav-amid hidroláz katalizálja, amely az anandamidot arachidonsavra és etanolamidra hasítja. Az arachidonsav aztán a megfelelő sejtekben COX-és LOX-mediált folyamatokban további aktív molekulákká alakulhat. Az ábrán késsel az anandamidot és szintézisének-lebomlásának közti termékeit, sárgával az átalakító enzimeket, pirossal a receptorokat jelöltük.

Az anandamid hosszú szénhidrogén-lánca zsíroldhatóvá teszi a molekulát, ezáltal könnyedén jut keresztül a membránokon. Ugyanakkor az anandamid sejten belüli szállításában és a lebomlás sebességének növelésében fontos szerepe lehet az anandamid transzportereknek (Fowler 2012). Fontos megjegyezni, hogy az anandamid a klasszikus neurotranszmitterekkel szemben nem tárolódik a sejteken belül, hanem a sejt stimulációját követően szintetizálódik, és onnan azonnal kiszabadul, intracellulárisan pedig a zsírsavamid-hidrolázok (FAAH) (Cravatt és mtsai. 1996), valamint különböző oxigenázok gyorsan átalakítják (6. ábra). Szerkezete (5. ábra) nagyon emlékeztet a tetrahidrokannabinolra (THC). A THC-val ellentétben azonban az anandamid könnyen lebomlik a szervezetben a sejten belüli hidrolízis következtében (Di Marzo és mtsai. 1994), mely folyamat eredménye az etanolamid és az arachidonsav.

Az arachidonsav a szervezetben linolsavból és linolénsavból szintetizálódik. Emlős sejtekben az arachidonsav szinte kizárólag a glicerofosfolipidek 2-acil pozíciójában észterifikálva fordul elő. A spontán felszabaduló arachidonsav szinte azonnal reészterifikálódik. Stimulált sejtekben az arachidonsav két úton válik szabaddá. A legfontosabb út az, amikor a PLA₂ enzimek hatására hidrolízissel szabadul fel foszfolipidekből. A nagy molekulatömegű PLA₂ specifikus, csak az arachidonsavat tartalmazó foszfolipidek hidrolízisét katalizálja az intracelluláris Ca²⁺-koncentráció növekedése esetén. A Ca²⁺-koncentráció emelkedés a PLA₂ plazmamembránhoz (és így a szubsztrátjához) történő transzlokációjához szükséges. Az arachidonsav felszabadulás másik útjához két enzim, a PLC és a diacil-glicerol-(DAG) lipáz aktivitása szükséges. A PLC hatására keletkezett diacil-glicerol lehet a DAG lipáz szubsztrátja és belőle szabadul fel az arachidonsav (6. ábra).

1.3.2. Az anandamid, mint endovanilloid

Az *in vivo* anandamid koncentrációjának szabályozásában fontos szerepe van az anandamid metabolizmusának. Az anandamid lebomlásának gátlásával koncentrációja a sejten belül megnőhet, ami aktiválhatja a TRPV1-et. A TRPV1 érzékenységet az anandamid iránt más endogén lipid molekulák hatásai is megnövelhetik, illetve a receptor foszforilációja is hozzájárulhat ezen érzékenyítéshez. Az anandamid TRPV1-en keresztül kifejtett hatásait ugyanakkor nagyban befolyásolják a sejtek típusai és a környezet is. Úgy tűnik, hogy az anandamid affinitása a TRPV1 iránt hasonló (De Petrocellis és mtsai. 2001; Ross és mtsai. 2001), illetve ötször gyengébb (Toth és mtsai. 2003), mint a kapszaicin affinitása a receptorhoz. Általánosságban elmondható, hogy az anandamid hatékonysága a TRPV1 iránt szövet-, expresszió- és fajfüggő (Ross 2003). Az anandamid a TRPV1 mediált válaszok részleges aktivátora lehet, ha a receptor expressziója alacsony, míg teljes aktivátora, ha a receptor expressziója magas a szövetekben.

1.3.3. Az anandamid jelentősége

Az anandamid legfontosabb tulajdonsága fájdalomcsökkentő hatása, melyet feltételezések szerint CB1 és CB2 receptorokon keresztül fejt ki (Jhaveri és mtsai. 2007). A CB1 receptor közvetített fájdalomcsökkentő hatás egyik legfontosabb problémája azonban a CB1 receptorok széleskörű expressziója a központi idegrendszerben, mely olyan lehetséges mellékhatásokhoz vezethet, mint a függőség, kognitív funkciózavarok és pszichózis. Az a megfigyelés, hogy a perifériás neuronokban expresszálódó CB1 receptorok stimulációjának önmagában fontos szerepe van a fájdalomcsökkentő hatásban, felveti annak reális lehetőségét, hogy perifériásan ható CB1 receptor agonistákat alkalmazzanak fájdalomcsökkentő terápiaként (Agarwal és mtsai. 2007). Ezen

megfontolásból kiindulva a CB1-en ható fájdalomcsillapítók kutatásának egyik fontos iránya lett az anandamid szintézisének és lebomlásának befolyásolása. Az anandamid nemcsak a központi idegrendszerben szintetizálódik, hanem aktivált makrofágokban (Di Marzo és mtsai. 1996; Wagner és mtsai. 1997) és perifériás szenzoros neuronokban (Ahluwalia és mtsai. 2003) is.

A fájdalmas ingerületek hatására szintetizálódó anandamid fájdalomcsökkentő hatását azonban nemcsak a kannabinoid, hanem a TRPV1-en is kifejtheti, mely receptorok szintén megtalálhatóak az érzőidegekben. Ugyanakkor érdekes lehetőséget jelenthet a fájdalomcsillapításra az a megfigyelés, hogy az anandamid képes ezen TRPV1 receptorokat deszenzitizálni (Lizanecz és mtsai. 2006). Ez arra utalhat, hogy az anandamid fájdalomcsökkentő hatásainak egy részét nemcsak a CB1 receptorok aktivációja, hanem a TRPV1 receptorok deszenzitizációja révén is kifejtheti.

A szelektív CB1 receptor antagonistá rimonabant rendkívül hatékonynak bizonyult a metabolikus szindróma és elhízás kezelésében, azonban a CB1 hatások gátlása nem okozott fokozott fájdalomérzetet (Patel és mtsai. 2007). Ez a megfigyelés két módon magyarázható: az endogén CB1 aktivitás aligha játszik jelentős szerepet a fájdalomérzet csökkentésében embereknél, illetve azzal, hogy az anandamid fájdalomcsökkentő hatását a központi idegrendszerben fejt ki, ahová a rimonabant nem jut be.

1.3.4. Az anandamid vazóaktív hatásai

Általánosságban elmondhatjuk, hogy az anandamid fájdalomcsökkentő hatása mellett vazodilatációt okoz (Ellis és mtsai. 1995; Randall és mtsai. 1997; Pratt és mtsai. 1998; Jari és mtsai. 1999; Wagner és mtsai. 1999; O'Sullivan és mtsai. 2004). Az anandamid által kiváltott vazodilatáció során a perivaszkuláris szenzoros neuronokban

aktiválódik a TRPV1, aminek következtében CGRP szabadul fel (Zygmunt és mtsai. 1999). Szintén vazodilatációt okoz a trigeminovaszkuláris rendszerben expresszáldó TRPV1 aktiválásával, ami független a CB1 receptoroktól (Akerman és mtsai. 2004). Ezen vazodilatatív hatások azonban nagymértékben különböznek az érrendszer különböző szakaszain. A nagy artériákban bizonyos esetekben jelentős (Zygmunt és mtsai. 1999; Mukhopadhyay és mtsai. 2002; Lopez-Miranda és mtsai. 2004; O'Sullivan és mtsai. 2004; O'Sullivan és mtsai. 2005), míg más esetekben csupán kismértékű (O'Sullivan és mtsai. 2004; Herradon és mtsai. 2007) relaxáció volt megfigyelhető. Fontos megjegyezni, hogy a dilatatív hatások sokszor a CB és TRPV1 receptoroktól is függetlenül jelentkeztek (Pratt és mtsai. 1998; Jarai és mtsai. 1999; O'Sullivan és mtsai. 2004; O'Sullivan és mtsai. 2005; Herradon és mtsai. 2007).

2. CÉLKITŰZÉS

Tudományos kutatásaim során az alábbi célkitűzéseim voltak:

1. A vaszkuláris TRPV1 jellemzése:
 - a TRPV1-et expresszáló vaszkuláris sejttípusok azonosítása,
 - a TRPV1 stimulációt követő vazokonstrikció mechanizmusának feltárása,
 - a vaszkuláris TRPV1 farmakológiai jellemzése,
 - annak vizsgálata, hogy a neuronális és vaszkuláris TRPV1 eltér-e farmakológiailag.

2. Az endovanilloid anandamid vaszkuláris hatásainak vizsgálata:
 - az anandamid által kiváltott vazodilatáció mechanizmusa,
 - a dilatációban milyen szerepe van a TRPV1 aktivációnak/deszzenzitizációnak.

3. METODIKÁK

Állatkísérleteink során a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérletes Etikai Bizottság által jóváhagyott protokolloknak megfelelően jártunk el. Az állatokat 12 órás periódusokban sötét, illetve megvilágított környezetben tartottuk, biztosítva számukra a víz és a táplálék folyamatos hozzáférhetőségét. A kísérleti protokollok előtt az állatokat nátrium pentobarbital (50 mg/ttkg) intraperitoneális adásával altattuk el, amely után a rágcsőből eltávolítottuk a gracilis izmot. Ezután az állatokon eutanáziát végeztünk.

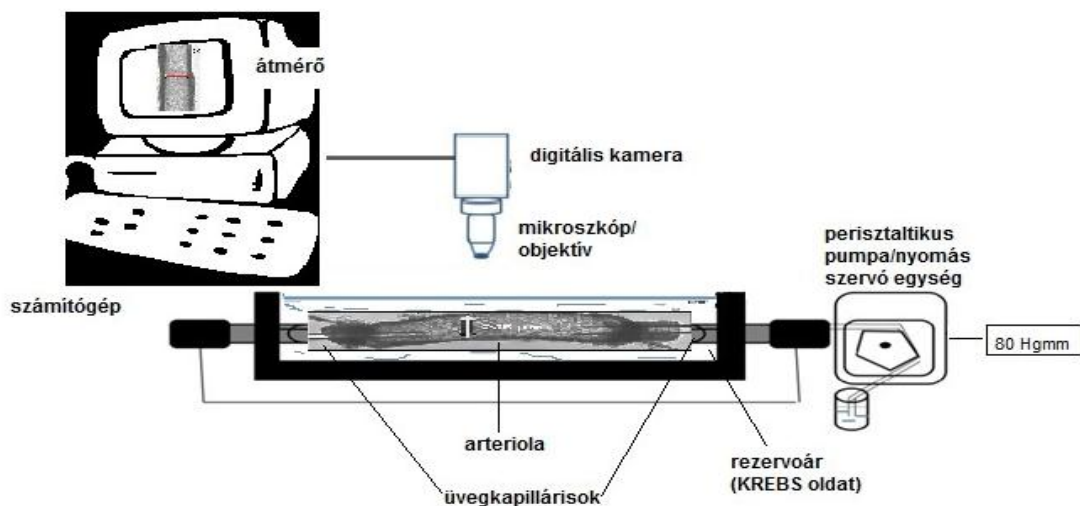
3.1. Kísérletes állatmodellek

Kísérleteinkhez hím Wistar patkányokat használtunk (Charles River, Isaszeg), amelyeket normál tápon tartottunk (CRLT/N táp, Szinbad Kft, Gödöllő). A patkányok mellett 12-14 hetes knockout TRPV1^{-/-} (C57BL/6-TRPV1^{tm1Jul/J}) és vad típusú (C57BL/6, Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) egereket is használtunk.

3.2. Izolált mikroértechnika

Patkány vázizomban (*musculus gracilis*) futó artéria izolálását és átmérőjének mérését Lizanecz és munkatársai által közölt módon (Lizanecz és mtsai. 2006) végeztük. A patkányok gracilis izmát kimetszettük és az izomban futó artériát mikrosebészeti eszközökkel, apró vágásokkal izoláltuk a körülötte lévő izomtól, a mellette futó idegtől és vénától, majd jégbe hűtött, oxigenált (5% CO₂, 10% O₂, 85% N₂) KREBS oldatban (110 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 1 mM KH₂PO₄, 5 mM glükóz és 24 mM NaHCO₃) tartottuk. Ezt követően az izolált ér mintegy 2 mm hosszúságú, mellékágak nélküli, artéria femorálisához közel eső szakaszát kimetszettük. Ezt az érszakaszt üvegapillárisok segítségével, egy speciális szervkádban (Living Systems Instrumentation, St. Albans, VT,

USA) kanuláltuk KREBS oldatban. Az oldatot Ca^{2+} tartalmú KREBS-re (2,5 mM CaCl_2 tartalmú KREBS) cseréltük, és a további kísérletek során kizárólag ezt az oldatot használtuk. Az oldatcserét követően a szervkád hőmérsékletét 37 °C-ra emeltük és a kísérleteket ezen a hőmérsékleten végeztük. Az ereket 80 Hgmm intraluminális nyomásnak tettük ki. Ennek hatására mintegy 40-60 perc alatt spontán kontrakció alakult ki (miogén tónus). Az erek átmérőjének változásait videomikroszkópia segítségével vizsgáltuk. A mérésekhez egyszerű fekete-fehér kamerát (TOPICA) (Topica Technology CO., Taipei, Taiwan), míg más esetekben az Intracellular Imaging Inc. (Cincinnati, OH, USA) által forgalmazott intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció mérésére is alkalmas rendszert használtunk. A képeket rögzítettük és offline elemeztük. A kísérletekben először az erek endotéliumának épségét vizsgáltuk acetilkolin (1 nM-10 μM , Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) hozzáadásával. Ép endotéliummal rendelkező erek esetében vazodilatációt tapasztaltunk. Ezt követően a simaizom funkciót ellenőriztük noradrenalin (1 nM-10 μM , Sigma-Aldrich) hozzáadásával. Csak abban az esetben folytattuk a kísérleteket, amennyiben az erek egyaránt válaszoltak mindkét fenti stimulusra (legalább 40% dilatáció és legalább 80% konstriktió). Az adatokat Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) és Graph Pad (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) szoftverek segítségével értékeltük (7. ábra).



7. ábra. A videomikroszkópos rendszer vázlatos rajza

A mikrosebészeti eszközökkel izolált ereket egy megfelelő szervkádban üvegkapillárisok segítségével kanuláltuk. Az intraluminális nyomást egy szervó kontrollált perisztaltikus pumpával állítottuk be. A szervkádba adott anyagok hatására bekövetkező érátmérő változásokat videomikroszkópos rendszerrel követtük. Általában az intraluminális érátmérőt határoztuk meg.

3.3. A TRPV1 agonisták vizsgálata

A TRPV1 agonisták hatására kialakuló érátmérő változásokat 0,1 nM-1 mM kapszaicin (Sigma-Aldrich), 1 pM-10 nM RTX, 0,1 nM-1 mM JYL-273, 0,1 nM-3 mM MSK-195, 3 pM-10 mM JYL-79 és 1 nM-1 mM JYL-1511 (Alexis, Enzo Life Sciences AG, Lausen, Switzerland) jelenlétében vizsgáltuk (szerkezeti képletüket lásd 5. ábra). A kapszaicin által kiváltott válaszok specifikitásának vizsgálatára a TRPV1 antagonistá AMG9810-et (Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA) használtuk. A kapszaicin dózis-hatás összefüggéseit az AMG9810 jelenlétében (100, 300 és 1000 nM) és annak hiányában is teszteltük. Az ereket 20 percig kezeltük az agonisták magas koncentrációjú dózisaival a receptor akut deszenzitizációjának (a válaszkészség csökkenése az agonista állandó jelenlétében) vizsgálata céljából. Egy alapos mosatás és 40 perces regenerációs fázis után a tachyphylaxis (a válaszkészség csökkenése az agonista újradását követően) vizsgálatát nagy koncentrációjú kapszaicin (1 μ M) adásával hajtottuk végre.

A gracilis arteriolákat vad típusú és TRPV1 knockout egerekből is izoláltuk. A kísérleteket ebben az esetben is az endotél és simaizom funkció ellenőrzése után végeztük el. A kapszaicin (0,1 nM-30 mM) dózis-hatás vizsgálatát mindkét egér típusnál elvégeztük.

3.4. Az agonisták egyensúlyi állandójának meghatározása a vaszkuláris TRPV1-hez

Adatainkon Schild plot (Arunlakshana és mtsai. 1959) analízist végeztünk. A kapszaicin félmaximális hatásának kiváltásához szükséges koncentrációt (EC_{50} értéket) az AMG9810 hiányában (A-val jelöltük) és jelenlétében (A'-vel jelöltük) is vizsgáltuk, majd $\log((A/A')-1)$ értékeket az AMG9810 koncentráció logaritmusának függvényében ábrázoltuk. A kapott pontokra egyenest illesztettünk, és az antagonistareceptor stabilitási állandót az X-tengely metszetével jellemeztük (lásd 10. B ábra).

3.5. Intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció mérése az érátmérő változások mellett

Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció méréséhez az arteriolákat az előzőleg leírt módon izoláltuk. Az ereket 60-120 percig inkubáltuk 1% BSA és 5 μ M fura2-acetoximetil észtert (Molecular Probes, Eugene, OR) tartalmazó Ca^{2+} -os KREBS oldatban, mely inkubáció alatt a spontán miogén tónus is kialakult. Ezt követően a méréseket Incyt Im2 imaging rendszerrel végeztük (Intracellular Imaging Inc.). Az ereket váltakozva 340 és 380 nm-en világítottuk meg. Az 510 nm-nél nagyobb hullámhosszú emittált fényt mértük. A képeket 2-5 másodpercenként vettük fel, a kiértékelés pedig offline módban történt. Az érátmérő meghatározásakor a fluoreszcens képeken látható külső érátmérőket használtuk.

3.6. Simaizomsejtek izolálása és intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció változások mérése

Intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció méréseinkhez felnőtt beagle kutyából származó koronária enzimatikusan izolált simaizom sejteket használtunk. Az állatokat 10 mg/ttkg ketamin hidroklorid (Calypsol, Richter Gedeon, Budapest, Magyarország) és 1 mg/ttkg xilazin hidroklorid (Sedaxylan, EURO-VET Állatgyógyászati Kft., Nagyatád, Magyarország) intravénás injekció adásával altattuk el. A szív állatból való eltávolítása után a jobb koronáriát kanuláltuk, majd a szívet átmostuk kalciummentes Joklik Modification Solution-nal (JMM, összetétel: taurin 2,5 g/L; piroszőlősav 175 mg/L; ribóz 750 mg/L; allopurinol 13,5 mg/L és NaH_2PO_4 200 mg/L). A kalciummentes JMM oldattal történő atmoszt legalább 5 percig végeztük 95% O_2 és 5% CO_2 gázkeverék átbuborékolatásával. Ezután az oldatot Dulbecco's Modified Eagle's Medium-ra (DMEM, Sigma-Aldrich) cseréltük; 2,5 cm hosszú szakaszt izoláltunk a jobb koronária artériából, majd mindkét végén kanuláltuk. A kanülok vége egy perisztaltikus pumpához volt csatlakoztatva, így a 3 mg/mL I-es típusú kollagenázt (Worthington, Lakewood, NJ, USA) tartalmazó DMEM oldatot az artéria lumenében keringettük 30 percen át. Ezután 60 percig 1 mg/mL elasztáz (Worthington) jelenlétében tartottuk az erezet. Az eddig recirkulált sejtekben gazdag oldatot 24 lyukú platekbe helyezett üveglapokra pipettáztuk szét. A sejtek letapadása után a tápfolyadékot DMEM oldatra cseréltük és a sejteket 60 percig sejttenyésztő termosztátba helyeztük. Az egy órás inkubációs periódus után a sejteket 2 órára 1 mg/mL BSA-t (Sigma-Aldrich) és 5 μM fura2-acetoximetil észtert (Molecular Probes) tartalmazó DMEM tápoldatba tettük. A sejteket ezt követően a mérésekig szobahőmérsékleten, sötétben tartottuk. Az individuális sejtek fluoreszcenciáját InCyt Im2 fluoreszcencia imaging rendszerrel mértük a fentieknek megfelelően. Méréseink során a sejteket 1 μM kapszaicinnal és 100 mM KCl-dal kezeltük. Az adatokat InCyt 4.5 software-

rel elemeztük és Excel (Microsoft Corporation), valamint GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.) programokkal dolgoztuk fel.

3.7. Eye-wiping teszt

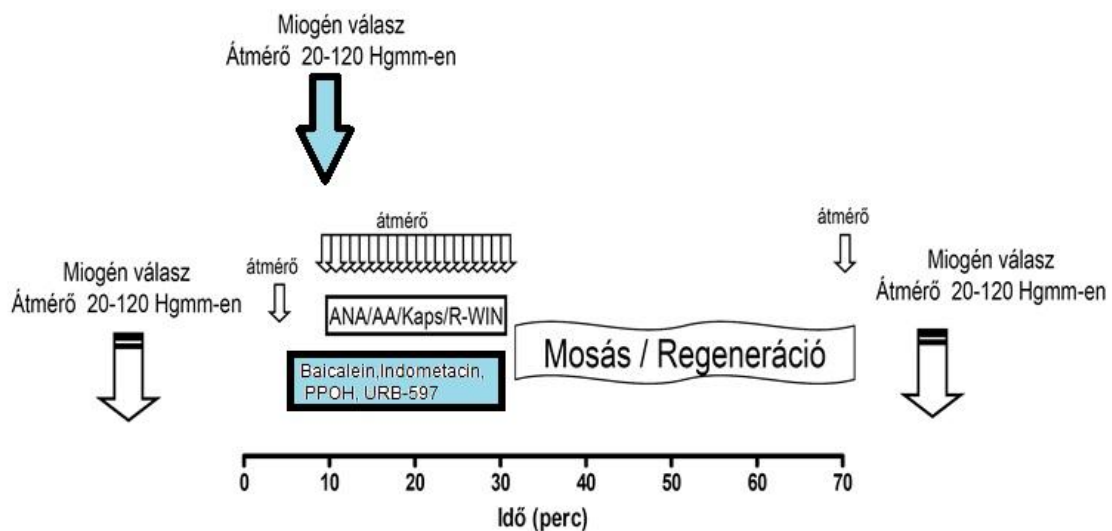
A fájdalom tesztek közé tartozó eye-wiping tesztet Jakab és munkatársai által közölt módon (Jakab és mtsai. 2005) végeztük el. Az állat jobb, illetve bal konjunktívájára 10 µl TRPV1 receptor agonistát (kapszaicin, 1 µM; RTX, 10 nM; JYL-273, 1 µM; MSK-195, 1 µM; JYL-79, 1 µM; JYL-1511, 1 µM) cseppentettük. Ezen anyagok irritálják a konjunktívát, fájdalmat és könnyezést váltanak ki, amelyre az állat intenzív szemtörléssel reagál. A szemtörlések számát 60 másodpercig számoltuk. A kontroll csoportokban ezen agonisták oldószerét cseppentettük az állatok konjunktívájára.

3.8. Az anandamid érátmérőre gyakorolt hatásainak vizsgálata

Izolált mikroér kísérleteinkhez az ereket az előzőekben leírt módon készítettük elő. Az endotél és simaizom funkció ellenőrzése után bizonyos kísérletekben az erek endotél rétegét eltávolítottuk levegőbuborék intraluminális térbe történő juttatásával. Az endotélfosztás sikerét minden esetben ellenőriztük az acetilkolin válasz hiányával, illetve az NO-donor nitroprusszid-nátrium alkalmazásával.

Az erek miogén válaszát átmérő meghatározással vizsgáltuk 20-120 Hgmm intraluminális nyomás alkalmazása mellett, majd a nyomást 80 Hgmm-re állítottuk az átmérőre gyakorolt konstriktív/dilatatív hatások vizsgálata érdekében. Az ereket anandamiddal (0,1-30 µM), arachidonsavval (1 µM), kapszaicinnel (TRPV1 agonista, 1 µM) (Lizanecz és mtsai. 2006), vagy WIN55-212-2-vel (CB1 és CB2 agonista, 1 µM)

(Kim és mtsai. 2008) kezeltük 20 percig, miközben az értámérőt 10 másodpercenként rögzítettük. Ezen kezeléseket 40 perc regenerációs fázis (alapos mosatás után) követte, és az értámérőt a kísérlet végén is rögzítettük. Végül, a miogén választ újra megmértük Ca^{2+} jelenlétében és annak hiányában is a fentieknek megfelelően. Néhány esetben az arteriolákat 5 percig előkezeltük baicaleinnel (lipoxigenáz inhibitor, 1 μ M, (Machha és mtsai. 2007), indometacinnal (ciklooxygenáz inhibitor, 10 μ M, (Xiang és mtsai. 2008), PPOH-val (epoxigenáz inhibitor, 20 μ M, (Xiang és mtsai. 2008) és a FAAH inhibitor URB-597-tel (1 μ M, (Piomelli és mtsai. 2006), és ezen előkezelések hatását is ellenőriztük mind az értámérőre, mind az erek miogén válaszára, mely méréseket az anandamidnál már fentebb említett kezelés és mérési sor követte.



8. ábra. Az elvégzett kísérletek sémája

A miogén tónust 20-120 Hgmm tartományban kapott értámérők alapján (aktív; Ca^{2+} jelenlétében, passzív; Ca^{2+} hiányában) határoztuk meg a kísérlet elején, végén és esetenként a gátlószeres előkezelések után (vastag nyilak). Az akut vazóaktív hatásokat 80 Hgmm-en, izobárikus körülmények között mértük a kísérletek elején, a TRPV1 agonista alkalmazása során, és a regenerációs periódus végén (keskeny nyilak). A kísérletek időbeosztása is látható az ábra x tengelyén.

3.9. Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai kísérletekhez a szövetek előkészítését Kark és munkatársai szerint végeztük (Kark és mtsai. 2008) kisebb módosításokkal. A patkányból a fentieknek megfelelő módon kimetszett gracilis izom kis darabját Tissue-tek O.C.T. oldatba (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) merítettük, majd folyékony nitrogénben fagyasztottuk. Ezt követően a blokkot kriosztátban metszettük (vastagság 10 μm) és a metszeteket adherens tárgylemezre (Electron Microscopy Sciences) helyeztük. A metszeteket acetonban fixáltunk 10 percig. A FAAH immunfestését már a korábban Cristino és munkatársai által leírt módon (Cristino és mtsai. 2008) végeztük. A fixált metszetet normál kecske szérummal blokkoltuk (1,5% PBS, Sigma-Aldrich) 20 percig. Az immunfestést FAAH ellenes antitesttel (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) 50 szeres hígításban végeztük. A FAAH-t expresszáló sejtek azonosítására simaizom aktint (Sigma-Aldrich, hígítás: 1:100) alkalmaztunk. Valamennyi elsődleges antitestet blokkoló pufferben hígítottuk. 90 perc inkubáció után a metszeteket tovább reagáltattuk biotinált anti-nyúl (Jackson, Suffolk, Anglia, hígítás: 1:300), anti-egér-FITC (Jackson, hígítás: 1:100) és Streptavidinnel konjugált Cy3 (Jackson, hígítás: 1:500) tartalmú PBS-sel, 1 órán át. Végül a metszeteket DAPI-t tartalmazó fedőanyaggal (Vector) fedtük és a kötődő antitesteket fluoreszcens mikroszkópban (Nikon Eclipse 80i) figyeltük meg, és egy kamera segítségével (Scion, Frederick, MD, USA) számítógéppel rögzítettük. Az ábra esetleges további formázását Image J program segítségével (NIH) végeztük.

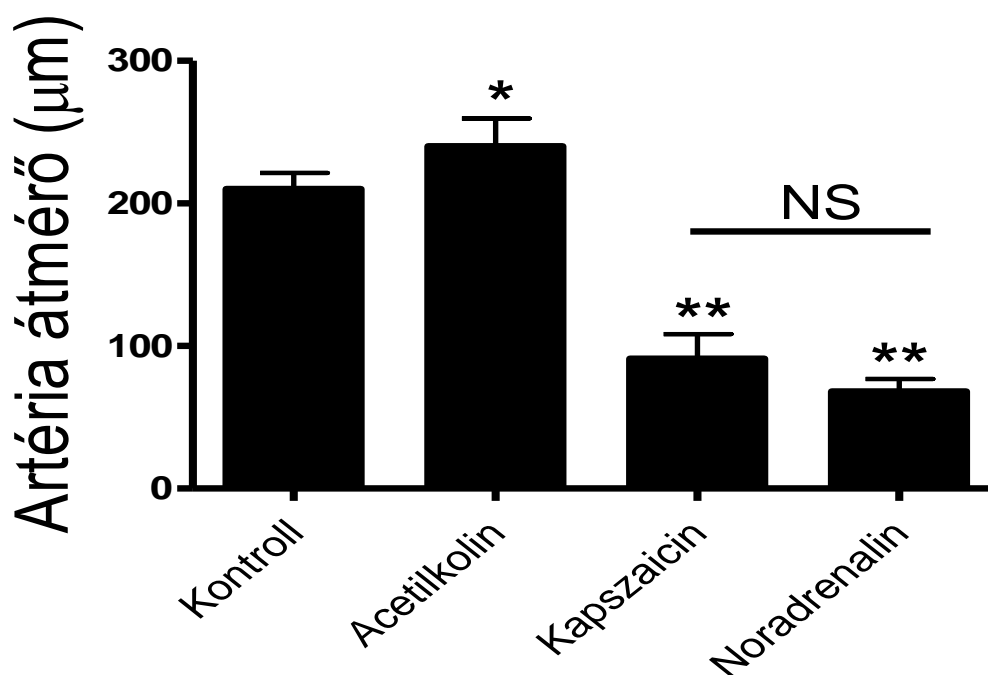
3.10. Statisztika

Az izolált erekben vazoaktív szerek hatására kialakuló átmérő-változásokat a maximális dilatáció százalékában fejeztük ki. Maximális dilatációként az ér 80 Hgmm-en, kalcium-mentes KREBS oldatban mért passzív átmérőjét vettük. Az ábrákon a nyert adatok átlagértékei \pm SEM szerepelnek. Statisztikai elemzéseinkhez Student féle t-próbát (a TRPV1 agonista kezelések előtt és után mért érátmérőket páros, míg az Eye-wiping teszt esetében a kontroll és kezelt állatok szemvakarásainak összehasonlítására páratlan t-tesztet), illetve kétutas ANOVA-t és Dunnett's post hoc tesztet használtunk. Az értékeket akkor tekintettük szignifikánsan különbözőnek, ha a $P < 0,05$ volt.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A TRPV1 aktiváció által kiváltott vaszkuláris hatások

A TRPV1 specifikus agonista kapszaicin (1 μM) a vázizom artériákon vazokonstriktiót eredményezett (érátmérő csökkenés: $210 \pm 11 \mu\text{m}$ -ről $91 \pm 17 \mu\text{m}$ -re, $n=7$, $P < 0,01$) (9. ábra). Ez a konstriktió a noradrenalin (10 μM) által kiváltott konstriktió mértékével volt összemérhető (noradrenalin által kiváltott érátmérő csökkenés: $68 \pm 9 \mu\text{m}$ -re, $n=7$, 9. ábra). Ezzel szemben az endotél-függő vazodilatátor acetilkolin dilatációt okozott (érátmérő növekedés: $240 \pm 20 \mu\text{m}$ -re, $n=7$, $P=0,03$, 9. ábra).

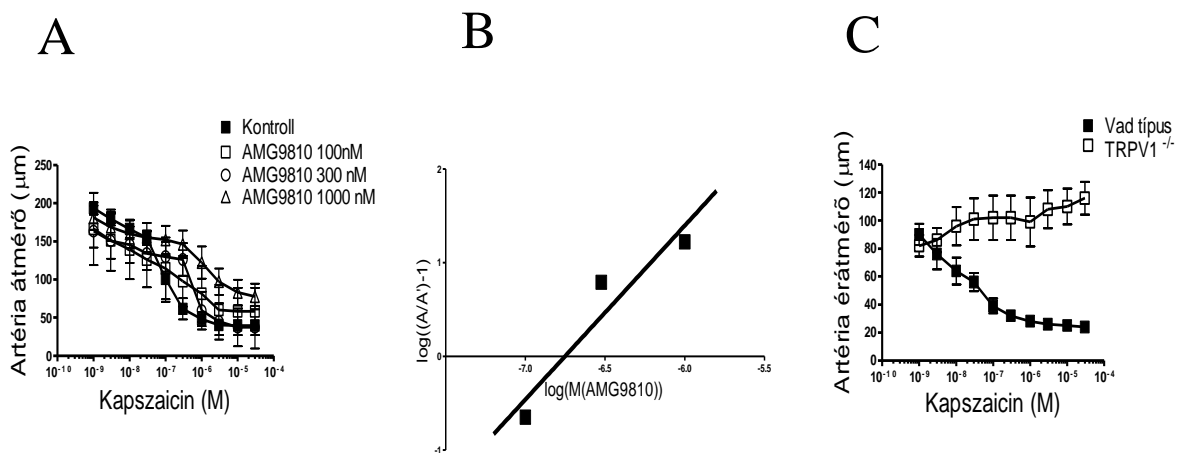


9. ábra. A TRPV1 stimulációjának hatásai vázizom arteriolákon

A belső érátmérőt 80 Hgmm nyomáson mértük gracilis artériákon (kontroll). A miogén tónus kialakulását és az endotél épségét az endotél-függő vazodilatátor acetilkolin (10 μM) jelenlétében vizsgáltuk. A TRPV1 specifikus agonista kapszaicin (1 μM) hatására bekövetkező konstriktió a noradrenalin (10 μM) által kiváltott vazokonstriktióhoz volt hasonló. A kísérleteket ugyanazon az artériákon végeztük ($n=7$). Az ábrán szereplő értékek átlagok \pm SEM. A szignifikáns különbségeket a kontrollhoz viszonyítva (* $P < 0,05$ vagy ** $P < 0,01$) csillaggal jelöltük.

4.2. A TRPV1 specifikus antagonistája AMG9810 hatásai

Az AMG9810 kompetitív módon gátolta a kapszaicin mediált válaszokat, amire a dózis-hatás görbe jobbra tolódásából következtettünk (10. A ábra). Az AMG9810 hatékonysága az általunk végzett kísérletekben (177 nM, 10. B ábra) összevethetőnek bizonyult az irodalomban található adatokkal (87,3 nM; (Gavva és mtsai. 2005)). A kapszaicin mediált kontraktilis válaszok TRPV1 specifitását TRPV1^{-/-} egereken is vizsgáltuk. A kapszaicin hatékonysága (EC₅₀) ezekben a vizsgálatokban 137 nM-nak (10. C ábra), a maximális hatás pedig vad típusú egyedekben 73%-nak bizonyult (érátmérő csökkenés: 90±8 μm-ról 24±3 μm-re, n=6, 10. C ábra). A kapszaicin kezelés a TRPV1^{-/-} egerek esetében nem vezetett vazokonstrikciónak.

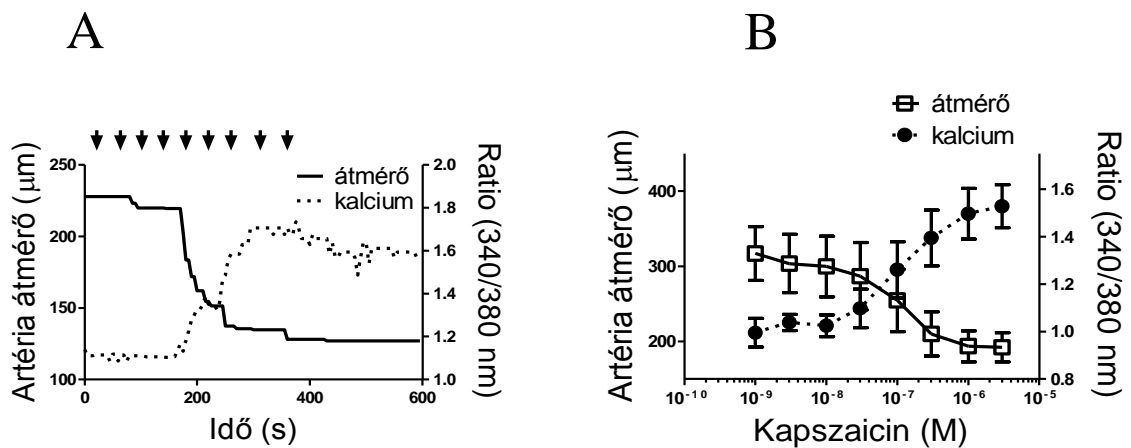


10. ábra. A kapszaicin kiváltotta vazokonstrikciónak TRPV1 specifitása

A kapszaicin különböző dózisaira (kumulatív dózis-hatás görbe) a TRPV1 specifikus antagonistája AMG9810 hiányában (kontroll, A panel) és jelenlétében (100, 300 és 1000 nM) kialakuló vazokonstrikciónak vizsgáltuk gracilis artériákon. Az ábrán szereplő értékek átlagok ± SEM, n=5-9. Az AMG9810 egyensúlyi disszociációs állandóját a hagyományos Schild plot analízissel határoztuk meg (B panel). Végül a kapszaicin mediált vazokonstrikciónak megvizsgáltuk kontroll (vad típusú) és TRPV1 knockout (TRPV1^{-/-}) egereken is (C panel). Az ábrán szereplő értékek átlagok ± SEM, n=5-6.

4.3. A TRPV1-mediált konstriktió mechanizmusa

A TRPV1 aktivációja depolarizációhoz és intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció emelkedéséhez vezethet. A kapszaicin mediált intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció változások vizsgálatára a Ca^{2+} -imaging rendszert alkalmaztuk. Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció és a patkány vázizom ereinek átmérő-változásait (ebben az esetben a külső érátmérőt) párhuzamosan, ugyanazon az éren vizsgáltuk (11. ábra). A kapszaicin mediált vazokonstriktió együtt változott az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációval (11. A ábra). Mind az érátmérő, mind az intracelluláris Ca^{2+} változások dózis-függő jellegűt mutattak (maximális hatás 1 μM -os koncentrációnál, 11. B ábra).

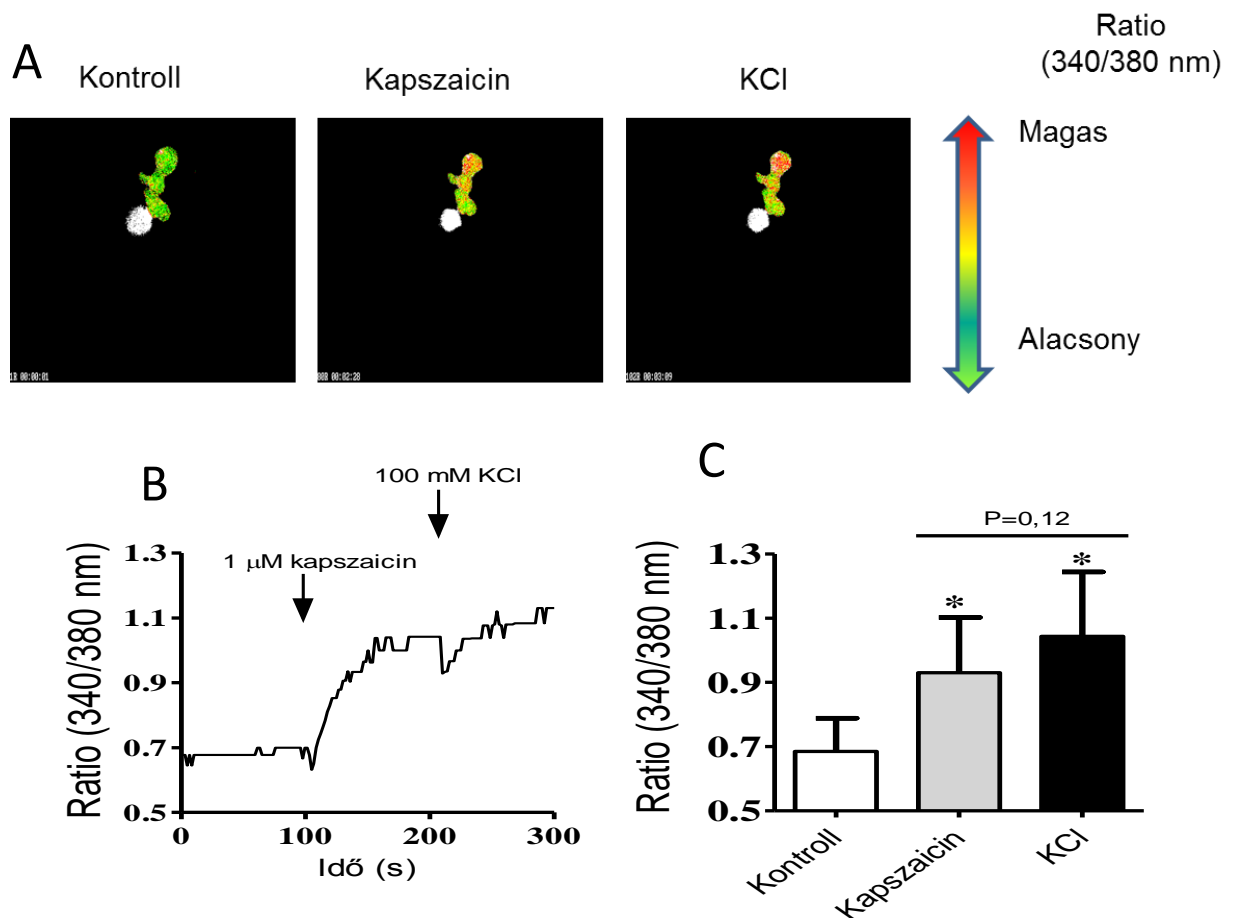


11. ábra. A kapszaicin kiváltott vazokonstriktió mechanizmusa: vázizomartériák

A kapszaicin kiváltott konstriktiót a Ca^{2+} változásokkal párhuzamosan követtük, az ábrán egy individuális kísérlet (A) és az átlagolt értékek (B) láthatóak. A folytonos vonal jelöli az artériák átmérőjét (külső érátmérő), míg a szaggatott vonal mutatja az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció változásokat 340/380 hullámhosszon mért gerjesztés arányában. A kapszaicint kumulatív dózisokban adagoltuk (az A panelen a nyilak jelölik az alkalmazott kapszaicin dózisokat: 0,1 nM-3 μM). Az ábrán szereplő értékek átlagok \pm SEM, n=5.

A TRPV1-et expresszáló sejttípus azonosítása érdekében arteriális simaizom sejteket izoláltunk kutyából származó koronária artériákból, majd az intracelluláris Ca^{2+} változásokat 1 μM kapszaicin és 100 mM KCl jelenlétében (12. ábra) vizsgáltuk.

A kapszaicinre 10 sejt esetében (a 28 vizsgált sejtéből, a 12. A és 12. B ábrákon a reprezentatív kísérlet eredménye látható) intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció növekedését tapasztaltuk. Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció emelkedés (340/380 arány növekedés: $0,69 \pm 0,10$ -ről $0,93 \pm 0,17$ -re, $P < 0,05$, 12. C ábra) hasonló volt a KCl-dal kiváltott depolarizáció következtében kialakuló intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció növekedéshez (340/380 arány növekedés: $1,04 \pm 0,20$ -re, 12. C ábra) ezekben a sejtekben.

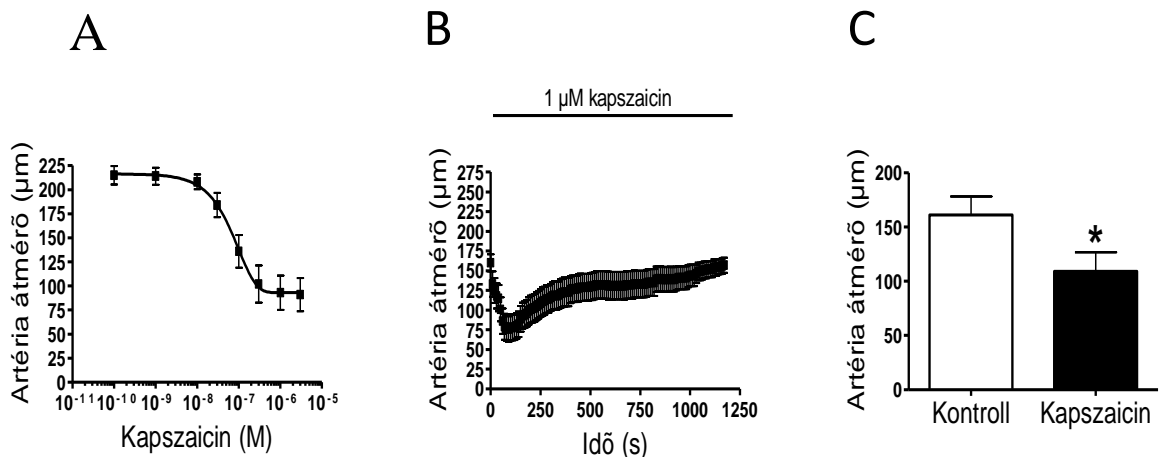


12. ábra. A kapszaicin mediált vazokonstriktió mechanizmusa: izolált arteriális simaizom sejtek

Kutya koronáriákból nyert simaizom sejteket Fura-2AM fluoreszcens festékkel töltöttük fel ($5 \mu\text{M}$), majd kapszaicinnal ($1 \mu\text{M}$) és KCl-dal (100 mM) kezeltük. Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció változásokat 340/380 hullámhosszon mért fluoreszcencia intenzitások alapján detektáltuk (egy reprezentatív mérés látható az A panelen, ahol a zöld szín az alacsony, míg a piros szín a magas Ca^{2+} -koncentrációt jelöli). Egy individuális sejt esetében az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció változását mutatja a B panel a kezelések hatására (kapszaicin, KCl, jelölve). Végül a kapszaicin érzékeny sejtek (28 életképes sejtéből 10) átlagolt eredményei is láthatóak (C). Az ábrán szereplő értékek átlagok \pm SEM. A szignifikáns különbségeket a kontrollhoz viszonyítva ($*P < 0,05$) csillaggal jelöltük.

4.4. A vaszkuláris TRPV1 farmakológiai tulajdonságainak vizsgálata

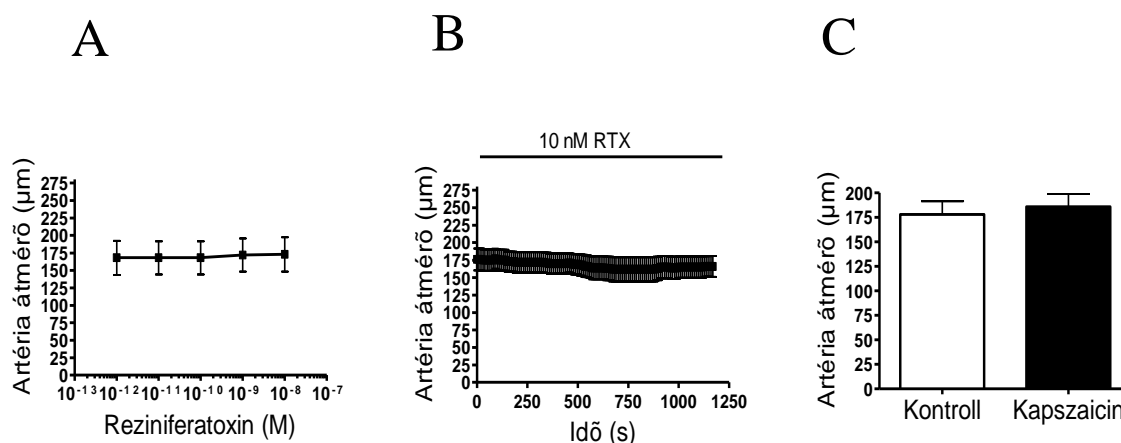
A továbbiakban behatóan vizsgáltuk a vaszkuláris TRPV1 farmakológiai tulajdonságait. A kapszaicin hatékonysága (EC_{50}) ebben az esetben 221 nM volt (13. A ábra), míg maximális hatása $58 \pm 7\%$ -os ($n=7$), amely ebben az elrendezésben sem különbözött szignifikánsan a noradrenalin által kiváltott konstriktiótól ($69 \pm 3\%$ konstriktió, $n=6$, $P=0,08$). A konstriktió kinetikáját 1 μ M kapszaicin hozzáadást követően 20 percig vizsgáltuk. A maximális konstriktió 90 másodperc alatt alakult ki (érátmérő csökkenés: $160 \pm 11 \mu\text{m}$ -ről $76 \pm 16 \mu\text{m}$ -re, $n=9$, 13. B ábra), majd a kezelés végére az erek átmérője a kiindulási értékre tért vissza (a receptor akut deszenzitizációja, a válasz csökkenése az agonista jelenlétében). Végül a tachyphylaxis jelenségét vizsgáltuk a 40 perces regenerációs fázis után kapszaicin (1 μ M) adásával. Az érátmérő $161 \pm 17 \mu\text{m}$ -ről $109 \pm 18 \mu\text{m}$ -re csökkent ($n=6$, $P < 0,05$, 13. C ábra), ami részleges tachyphylaxisra utalt.



13. ábra. A kapszaicin által kiváltott vaszkuláris hatások karakterizálása

A kísérleteket kanulált vázizom artériákon végeztük. Először a dózis-hatás görbéket vettük fel (A, $n=7$). Az izolált artériák egy újabb csoportját 20 percig kezeltük 1 μ M kapszaicinnal, az érátmérőket 10 másodpercenként rögzítettük (B, $n=9$). A 20 perces kezelés után egy alapos mosatás, majd 40 perces regenerációs fázis következett. A regenerációs fázis végén a tachyphylaxis jelenségét vizsgálva 1 μ M kapszaicint adtunk (C, $n=7$). Az ábrán szereplő értékek átlagok \pm SEM. A szignifikáns különbségeket a kontrollhoz viszonyítva ($*P < 0,05$) csillaggal jelöltük.

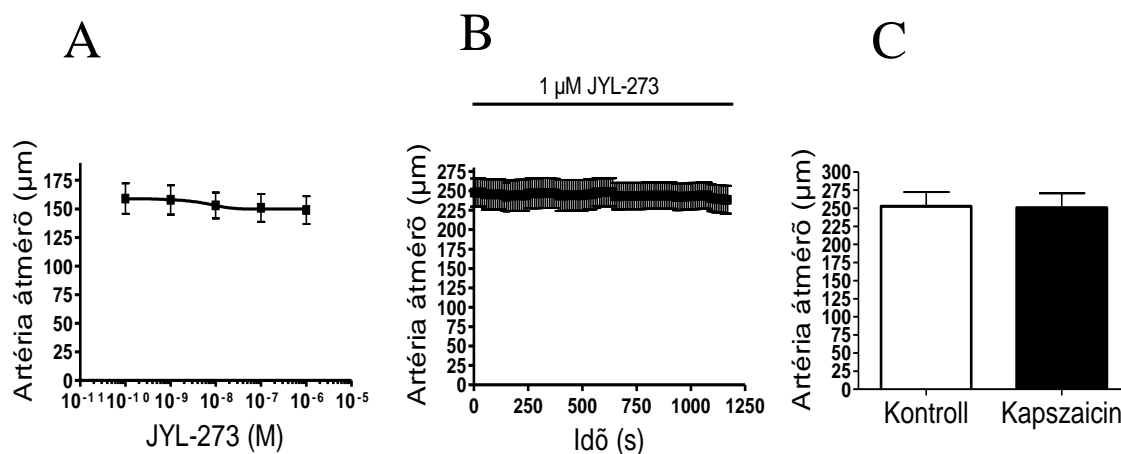
Az ultrapotens TRPV1 agonista RTX (14. ábra) vizsgálatát hasonló körülmények között végeztük. Az 1 pM-10 nM-os koncentráció tartományban (14. A ábra) az RTX nem váltott ki vazóaktív hatásokat. A tachyphylaxis vizsgálata kapcsán azonban a 40 perces regenerációs fázis végére a receptor teljes deszenzitizációját tapasztaltuk (14. B és 14. C ábra).



14. ábra. A RTX vaszkuláris hatásai

A kísérleteket kanulált vázizom artériákon végeztük. Először a dózis-hatás görbéket vettük fel (A, n=3). Az izolált artériák egy újabb csoportját 20 percig kezeltük 10 nM RTX-al, az érátmérőket 10 másodpercenként rögzítettük (B, n=5). A 20 perces kezelés után egy alapos mosatás, majd 40 perces regenerációs fázis következett. A regenerációs fázis végén a tachyphylaxis jelenségét vizsgálva 1 µM kapszaicint adtunk (C, n=5). Az ábrán szereplő értékek átlagok ± SEM.

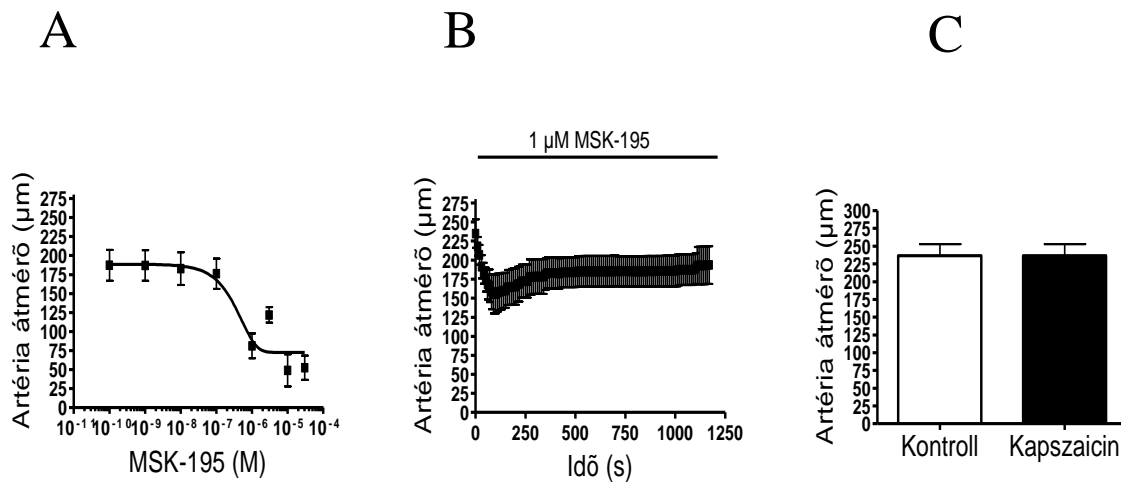
A JYL-273 (15. ábra) egy újabb TRPV1 agonista, amelyet vizsgáltunk. Ez az anyag szintén nem volt képes vazokonstriktiót kiváltani az általunk vizsgált vázizomerekből (0,1 nM-0,1 µM, n=7, 15. A ábra). A 20 perces kezelés alatt a JYL-273 esetében sem figyeltünk meg vazóaktív hatást (n=5, 15. B ábra), míg ezen agonista a RTX-hoz hasonlóan, szintén a receptor teljes deszenzitizációját okozta (n=4, 15. C ábra).



15. ábra. A JYL-273 vaszkuláris hatásai

A kísérleteket kanulált vázizom artériákon végeztük. Először a dózis-hatás görbéket vettük fel (A, n=7). Az izolált artériák egy újabb csoportját 20 percig kezeltük 1 μM JYL-273-mal, az érátmérőket 10 másodpercenként rögzítettük (B, n=5). A 20 perces kezelés után egy alapos mosatás, majd 40 perces regenerációs fázis következett. A regenerációs fázis végén a tachyphylaxis jelenségét vizsgálva 1 μM kapszaicint adtunk (C, n=4). Az ábrán szereplő értékek átlagok ± SEM.

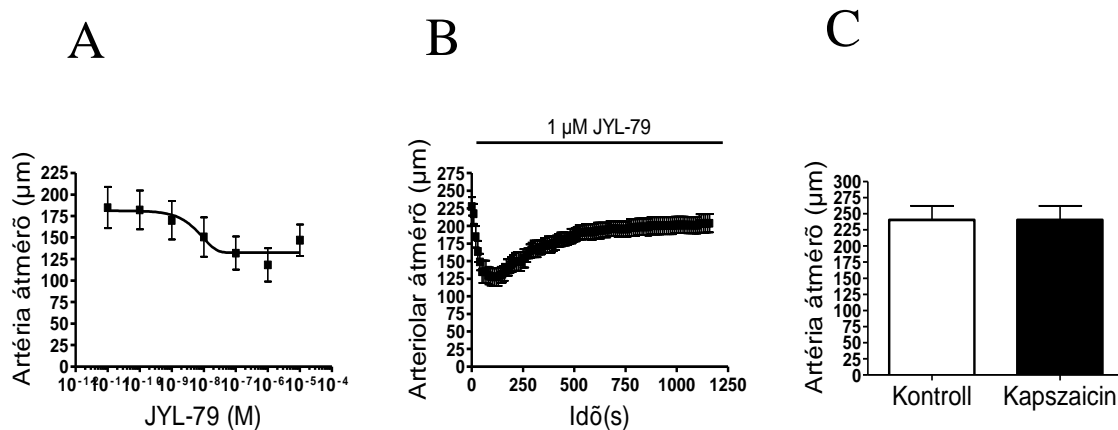
Kísérleteinkben az MSK-195 (16. ábra) hatékonysága 120 nM-nak, míg maximális hatása 71±11%-nak (n=5, 16. A ábra) bizonyult. A 20 perces kezelés alatt 1 μM MSK-195 hatására tranziens konstriktió alakult ki (érátmérő csökkenés: 255±19 μm-ről 155±25 μm-re 90 másodperc alatt, n=6, 16. B ábra). Az akut deszenzitizáció kinetikáját vizsgálva azonban lassúbb kinetikájú konstriktiót kaptunk a kapszaicinhez képest, illetve az érátmérő a 20 perces inkubációs periódus végére nem tért vissza a kiindulási érátmérő értékére (érátmérő: 193±25 μm, p=0,03 összevetve a kezelés előtti érátmérővel, n=6, 16. B ábra). Az előzőekben leírt agonistákhoz hasonlóan az MSK-195 is képes volt a TRPV1 receptor teljes deszenzitizációját kiváltani (16. C ábra).



16. ábra. Az MSK-195 vaszkuláris hatása

A kísérleteket kanulált vázizom artériákon végeztük. Először a dózis-hatás görbéket vettük fel (A, n=5). Az izolált artériák egy újabb csoportját 20 percig kezeltük 1 μM MSK-195-tel, az érátmérőket 10 másodpercenként rögzítettük (B, n=6). A 20 perces kezelés után egy alapos mosatás, majd 40 perces regenerációs fázis következett. A regenerációs fázis végén a tachyphylaxis jelenségét vizsgálva 1 μM kapszaicint adtunk (C, n=6). Az ábrán szereplő értékek átlagok ± SEM.

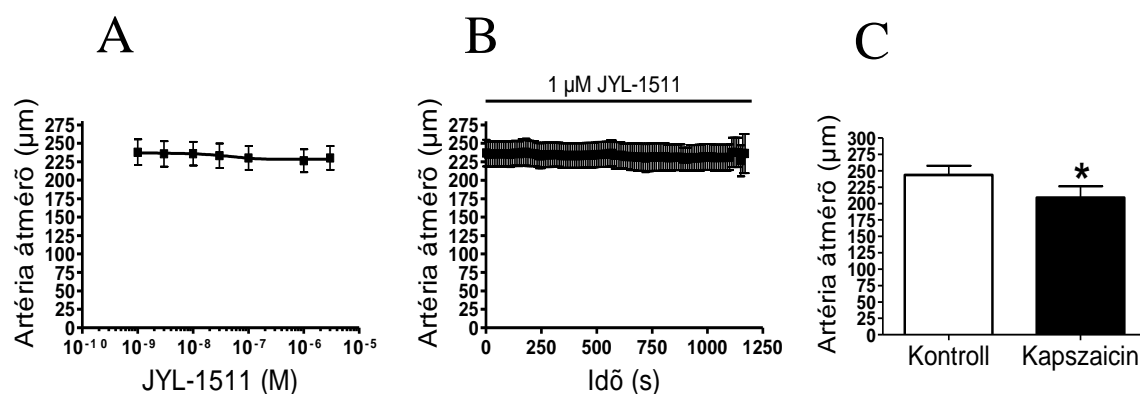
A JYL-79-et találtuk a leghatásosabb vaszkuláris TRPV1 receptor agonistának (EC₅₀=3,6 nM, n=8, 17. A ábra). Maximális hatása 39±8%-nak bizonyult (n=8, 17. A ábra). 1 μM-os koncentrációban (érátmérő csökkenés: 228±13 μm-ről 127±12 μm-re 100 másodperc alatt, n=5, 17. B ábra) szintén tranziens vazokonstriktiót okozott. Az akut deszenzitizáció vizsgálata során az átmérő nem tért vissza a kezelés előtti értékre (érátmérő a 20 perces kezelés végén: 204±12 μm, p=0,046 a kezelés előtti érátmérőhöz képest, n=5, 17. B ábra). A 40 perces regenerációs fázist követően azonban az 1 μM kapszaicin hatástalan volt (n=5, 17. C ábra).



17. ábra. A JYL-79 vaszkuláris hatásai

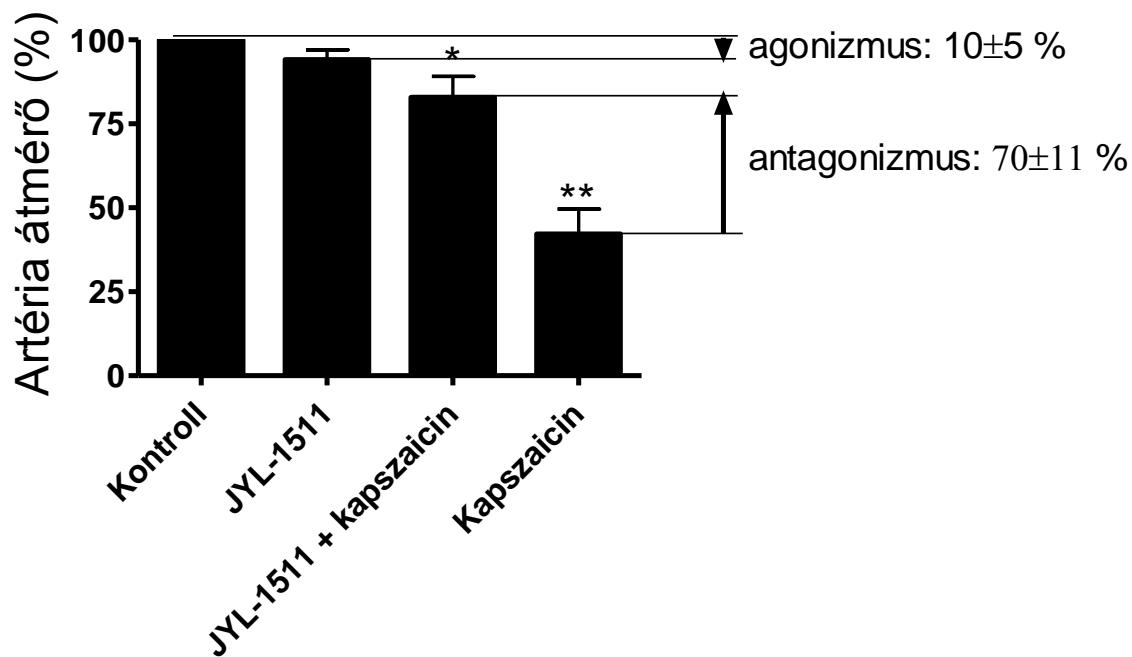
A kísérleteket kanulált vázizom artériákon végeztük. Először a dózis-hatás görbéket vettük fel (A, n=8). Az izolált artériák egy újabb csoportját 20 percig kezeltük 1 μM JYL-79-cel, az érátmérőket 10 másodpercenként rögzítettük (B, n=5). A 20 perces kezelés után egy alapos mosatás, majd 40 perces regenerációs fázis következett. A regenerációs fázis végén a tachyphylaxis jelenségét vizsgálva 1 μM kapszaicint adtunk (C, n=5). Az ábrán szereplő értékek átlagok ± SEM.

A TRPV1 stimulációs küszöbének megbecslése érdekében a parciális agonista JYL-1511-et is használtuk. A JYL-1511 dózis-hatás vizsgálata során (18. A ábra) a legmagasabb koncentrációban (1 μM) az érátmérő a kezelést megelőző 239±17 μM-hez képest 226±15 μM-re változott (P >0,05). A 20 perces kezelés (1 μM) során nem tapasztaltunk érátmérő változást (18. B ábra). A 40 perc regenerációt követően az 1 μM kapszaicin az érátmérőt a JYL-1511 jelenlétében (1 μM) 209±17 μM-re csökkentette. Ezen számszerű adatok alapján a JYL-1511 hatása a TRPV1-en 10±5% agonizmus és 70±11% antagonizmus tartományba esik (19. ábra).



18. ábra. A JYL -1511 vaszkuláris hatásai

A kísérleteket kanulált vázizom artériákon végeztük. Először a dózis-hatás görbéket vettük fel (A, n=5). Az izolált artériák egy újabb csoportját 20 percig kezeltük 1 μM JYL-1511-gyel, az érátmérőket 10 másodpercenként rögzítettük (B, n=5). A 20 perces kezelés után egy alapos mosatás, majd 40 perces regenerációs fázis következett. A regenerációs fázis végén a tachyphylaxis jelenségét vizsgálva 1 μM kapszaicint adtunk (C, n=5). Az ábrán szereplő értékek átlagok \pm SEM. A szignifikáns különbségeket a kontrollhoz viszonyítva (* $P < 0,05$) csillaggal jelöltük.

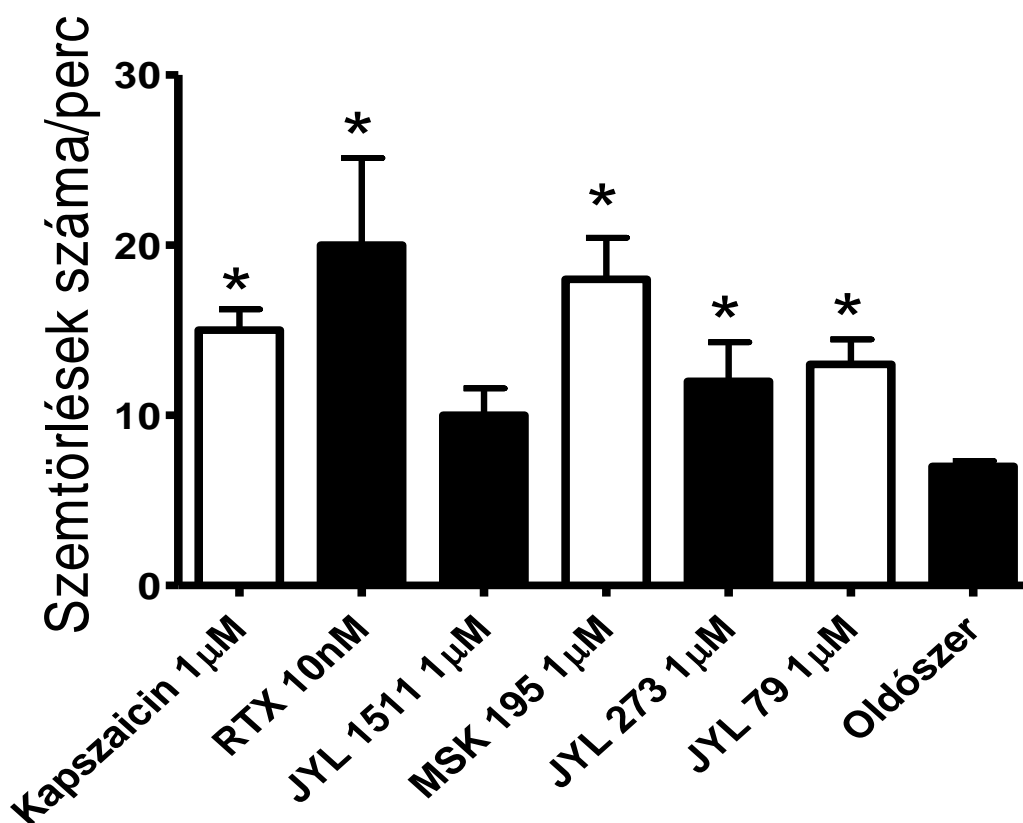


19. ábra. A JYL-1511 hatásai a vaszkuláris simaizmokban expresszáldó TRPV1-re

Az erek kiindulási átmérőjét a kezeléseik előtt (kontroll, n=6), majd 1 μM JYL-1511 (JYL-1511, n=6) jelenlétében is meghatároztuk. A kapszaicin mediált válaszokat 1 μM JYL-1511 jelenlétében is vizsgáltuk (JYL-1511+kapszaicin, n=6). Végül az erek egy újabb csoportjához 1 μM kapszaicint is adtunk (kapszaicin, n=7). A JYL-1511 maximális hatását, mint parciális agonista a kapszaicin által kiváltott átmérő csökkenés százalékához (100% kapszaicin), míg, maximális hatását, mint parciális antagonistát a JYL-1511 jelenlétében (1 μM , JYL-1511+kapszaicin) szintén a kapszaicin kiváltotta konstriktió százalékához (100% kapszaicin) viszonyítva határoztuk meg. Az ábrán szereplő értékek átlagok \pm SEM. A szignifikáns különbségeket a kontrollhoz viszonyítva (* $P < 0,05$) csillaggal jelöltük.

4.5. A vaszkuláris és szenzoros neuronális TRPV1 populációk közötti különbségek

Tanulmányunk egyik fontos célja az volt, hogy összehasonlítsuk a szenzoros neuronokban expresszálandó és a vazokonstriktió kialakításában fontos TRPV1 populációkat. A szenzoros neuronális funkciókat eye wiping tesztet alkalmazva *in vivo* vizsgáltuk. A JYL-1511 nem okozott szignifikáns növekedést a kontrollhoz képest a szentörlések számában, míg a többi általunk használt TRPV1 receptor agonista növelte azokat (20. ábra).

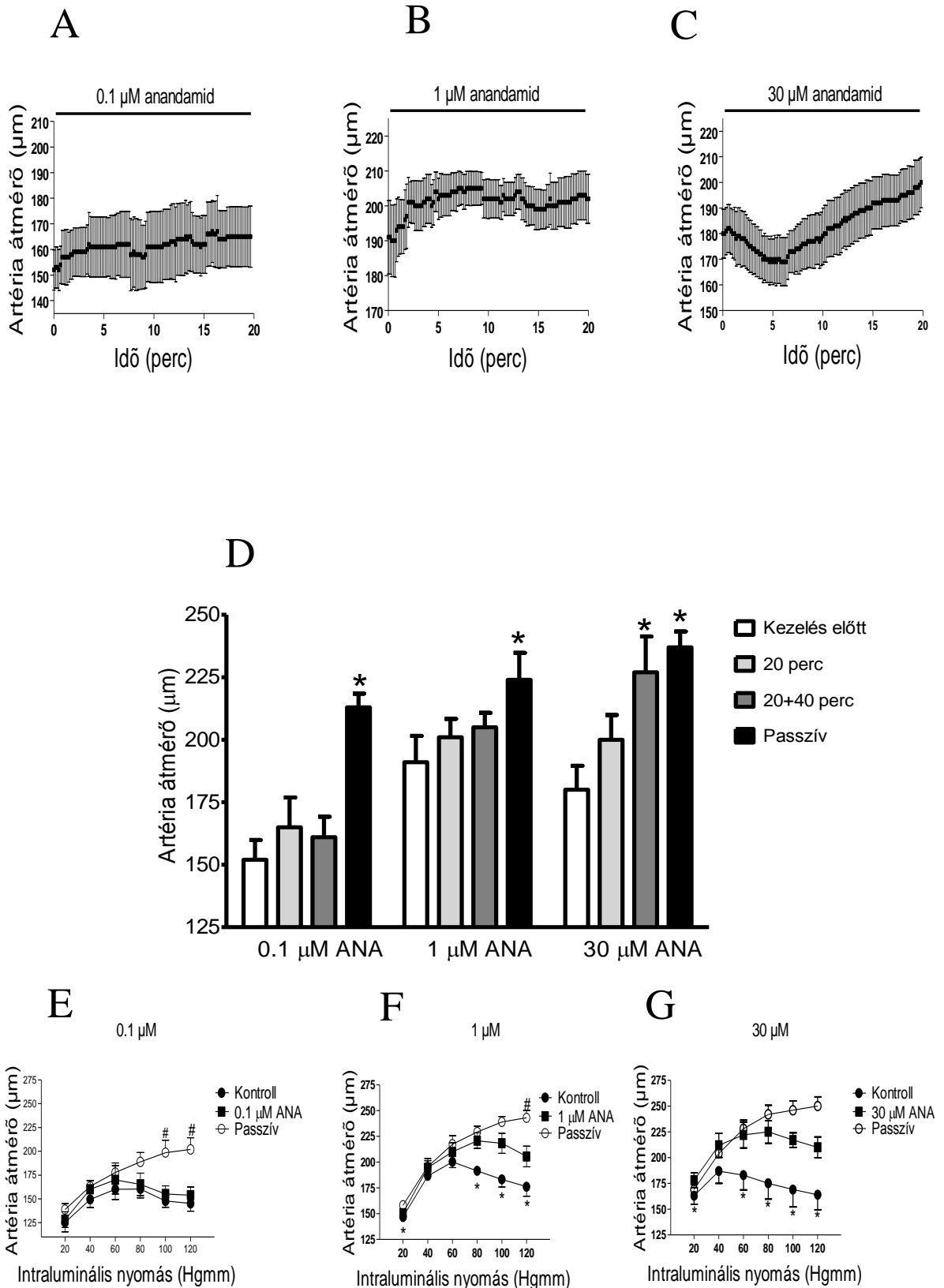


20. ábra. A TRPV1 ligandok által kiváltott szenzoros neuronális irritáció

Az állat jobb, illetve bal konjunktívájára a TRPV1 receptor agonisták egy-egy cseppjét (10 µl), illetve oldószerüket cseppentettük, majd a szemtörlések számát 60 másodpercig számoltuk. Az agonisták dózisait a vaszkuláris kísérletek során kapott telítési görbék (vagy ezek hiányában a legnagyobb alkalmazott dózisok) alapján határoztuk meg. Az ábrán szereplő értékek átlagok ± SEM (n=5). A szignifikáns különbségeket (* $P < 0,05$) a kontrollhoz viszonyítva (oldószerrel cseppentettünk az állatok szemébe) csillaggal jelöltük.

4.6. Anandamid által kiváltott vazodilatáció

Az anandamid által kiváltott vaszkuláris hatásokat izolált vázizom arteriolákon tanulmányoztuk. Az anandamid alacsonyabb dózisban (0,1 μM) hatástalan volt a 20 perces kezelés és az ezt követő 40 perces regenerációs fázis után is (21. A ábra). 1 μM -nál magasabb dózisokban azonban dilatációt okozott (21. B ábra). A 30 μM anandamid hatására a 20 perces kezelés első 10 perce során tranziens konstriktió, míg a következő 10 perc alatt egy lassan kialakuló, fokozatos dilatáció volt megfigyelhető, mely maximumát a kezelés végére érte el (21. C és D ábra). Ebben a rendszerben a 40 perces regenerációs fázist követően meglepő módon az anandamiddal kezelt erek esetében a dilatációk mértéke nem csökkent, hanem növekedett, elérve a lehetséges maximális értéket (Ca^{2+} nélküli KREBS-ben mért átmérő) (21. D ábra).



21. ábra. Anandamid hatásai vázizom arteriolákon

Az izolált artériákat 20 percig anandamiddal kezeltük (0,1, 1, 30 μM , n=5, 10, A-C panel), majd az értátmérőket 10 másodpercenként rögzítettük. Az ábrán szereplő értékek átlagok \pm SEM (A-C panel). Az 1D.

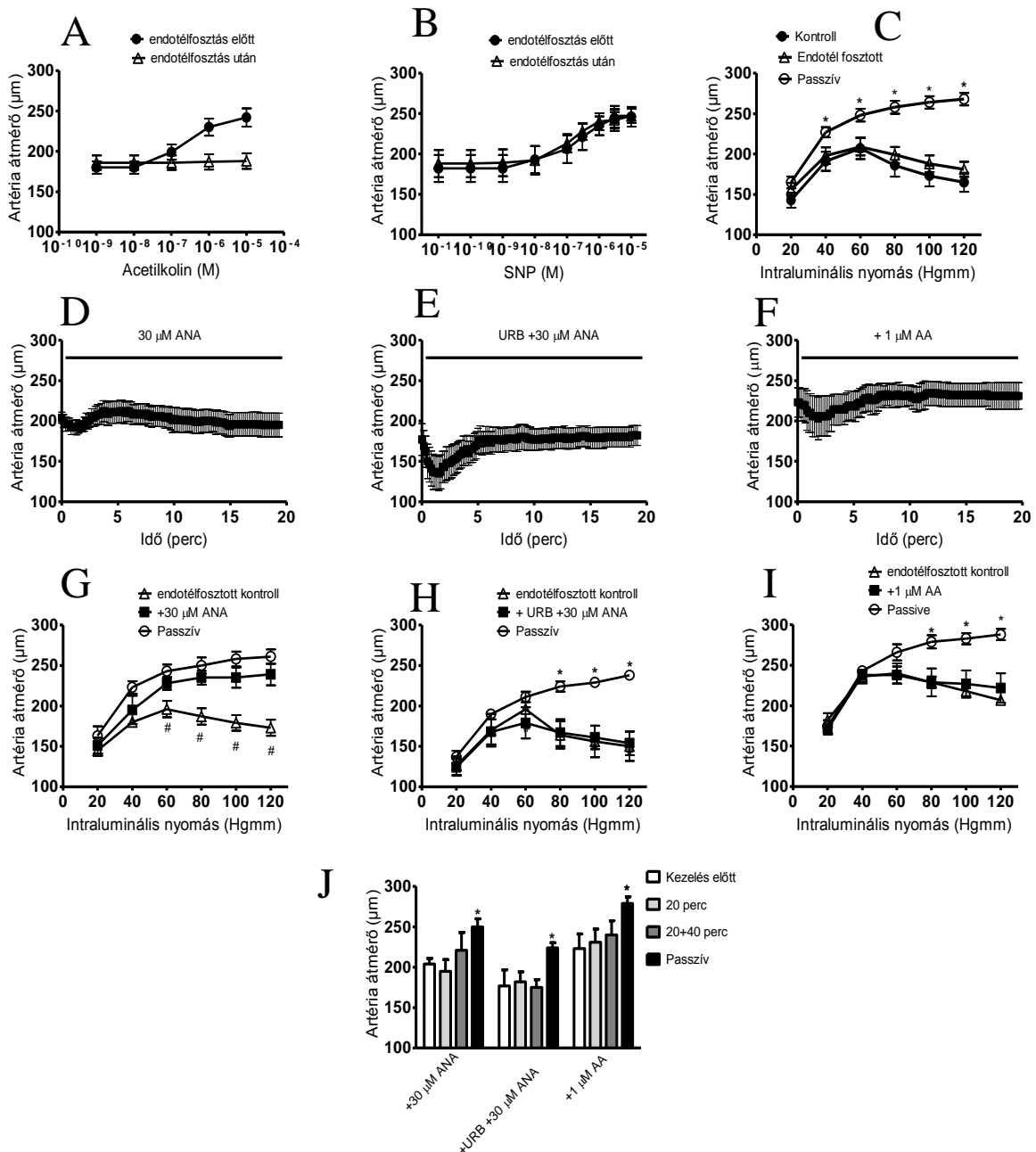
ábra az érátmérők átlagait mutatja. Az üres oszlopok a kezelések előtt mért, a halványszürke oszlopok a 20 perces anandamid kezelés hatásait, a sötétszürke oszlopok a regenerációt követő (mosás, majd 40 perces regenerációs fázis), míg a fekete oszlopok a passzív átmérőt (10 μM acetilkolin hatása) ábrázolják. A szignifikáns különbségeket a kontrollhoz képest ($*P < 0,05$) csillaggal jelöltük. Végül a miogén tónusra gyakorolt hatást vizsgáltuk. Az arteriolák érátmérőjét 20-120 Hgmm intraluminális nyomáson mértük az anandamid kezelés (0,1, 1, 30 μM , $n=4, 5, 10$, E-G panel) előtt (kontroll, ●), a 20 perces kezelést követő 40 perces regenerációs fázis után (■) és Ca^{2+} hiányában (passzív, ○). Az ábrán szereplő értékek átlagok \pm SEM (E-G panel). A szignifikáns különbségeket ($P < 0,05$) csillaggal (*) jelöltük, ha a kezelt érátmérőket az aktív, miogén tónussal rendelkező erekkel hasonlítottuk össze, míg a kettős kereszt (#) esetében a kezelt ereket a passzív érátmérőhöz viszonyítottuk.

4.7. Az anandamid hatásai az erek miogén tónusára

A kanulált vázizomerek, melyeket tanulmányunkban felhasználtunk, spontán miogén tónussal rendelkeztek (különbség a Ca^{2+} jelenlétében és hiányában mért átmérők között). A miogén tónussal rendelkező erek esetében a dilatatív hatások oka lehet a miogén tónust fenntartó mechanizmusok gátlása/csökkenése is. Ezen mechanizmusok vizsgálatára az erek miogén válaszát is vizsgáltuk a kísérlet elején (kontroll), a 20 perces kezelés, majd az ezt követő regenerációs fázis végén is (aktív miogén tónus), továbbá az extracelluláris Ca^{2+} hiányában (passzív tónus). A 0,1 μM koncentrációjú anandamid nem volt hatással a miogén tónusra (21. E ábra). Megfigyeléseink szerint a 20 perces kezelés, melyet 40 perc regeneráció követett, a miogén tónus teljes eltűnésével járt együtt a magasabb koncentrációjú anandamid (1 és 30 μM , 21. F és G ábra) esetében. Ezek az eredmények egy anandamid szenzitív útvonalat valószínűsítenek, amely felelős lehet a dilatációt kiváltó ágensek szintéziséért és felszabadulásáért. Ezen ágensek csökkenthetik a miogén válaszokat. Általában a dilatatív ágensek képződésének fő forrása az erek endotél rétege, míg a miogén válaszokért a simaizom sejtek felelősek.

4.8. Az endotél szerepe az anandamid által kiváltott vazodilatációban

Endotél-fosztott ereken is vizsgáltuk az anandamid hatásait. Először az endotélfosztás sikerességét vizsgáltuk az endotél-függő vazodilatátor acetilkolin hozzáadásával (22. A ábra). Az acetilkolin-mediált dilatatív válaszok károsodtak (endotélfosztás előtt az acetilkolin kiváltott érátmérőnövekedés: $180 \pm 8 \mu\text{m}$ -ről $242 \pm 11 \mu\text{m}$ -re, $p < 0,05$, ami az endotél-fosztott erek esetében: 173 ± 14 -ről $188 \pm 10 \mu\text{m}$ -re, $n=5$). Az acetilkolin csökkent dilatatív hatásaiért az endotél sejtek csökkent NO termelése volt felelős, mert a NO donor nitroprusszid-nátrium (SNP) hatására maximális dilatáció alakult ki (22. B ábra, $n=5$). Az endotélfosztás az erek miogén tónusát nem érintette (22. C ábra, $n=11$). A sikeres endotélfosztást követően $30 \mu\text{M}$ anandamid jelenlétében elvégeztük ugyanazokat a kísérleteket, mint az ép endotéllel rendelkező ereink esetében. Az anandamid ($30 \mu\text{M}$) által kiváltott bifázisos hatás dilatatív komponense megszűnt az endotél-fosztott erek vizsgálata során (22. D és J ábra). A miogén tónusra gyakorolt hatás azonban hasonló volt az ép endotéllel rendelkező erek esetében kapott eredményeinkhez (22. G ábra).



22. ábra. Az anandamid hatásai az érátmérőre endotélfosztást követően

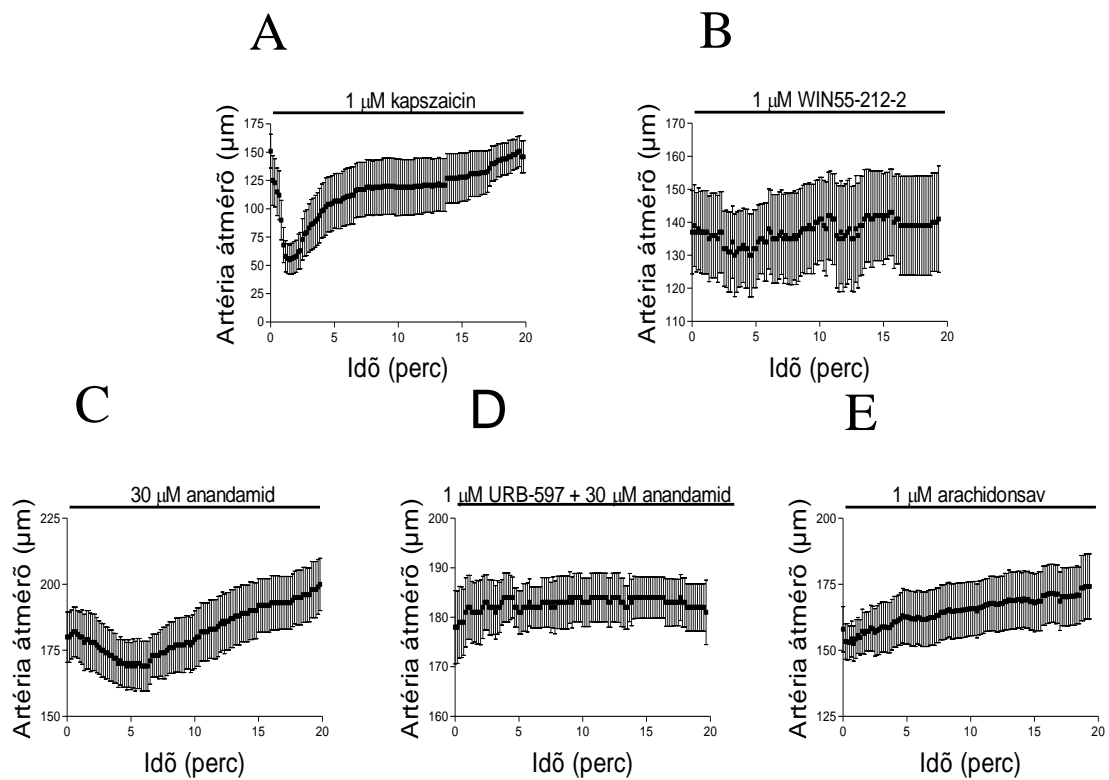
Az endotélfosztás sikerességét acetilkolin adásával ellenőriztük (A panel, n=5). A simaizom sejtek NO érzékenységét nátrium-nioprusszid adásával ellenőriztük (SNP, B panel, n=5), majd az endotélfosztás miogén tónusra gyakorolt hatását vizsgáltuk (C panel). Az érátmérőket 20-120 Hgmm intraluminális nyomáson mértük az endotélfosztás előtt (●), után (▲) és Ca^{2+} hiányában (passzív, ○). A miogén tónust anandamid kezelés után (30 μM, 20 perc, amit 40 perces regenerációs fázis követett, G panel, n=5) és arachidonsav kezelés után (1 μM, 20 perc, amit 40 perces regenerációs fázis követett, I panel, n=4) is lemértük. Az anandamid mediált válaszokat a FAAH antagonist URB-597 jelenlétében is vizsgáltuk (1 μM, 15 perc előkezelés, H panel, n=5). Az anandamid akut hatásait a 20 perces kezelés alatt vizsgáltuk, aminek során az érátmérőket 10 másodpercenként mértük (D–F panel). A 20 perces kezelés után a 40 perces regenerációs fázis végén ismét vizsgáltuk a miogén tónusra gyakorolt hatásokat. A J panel az átlagolt eredményeket mutatja. Az ábrán szereplő értékek átlagok ± SEM (E–G panel). A szignifikáns különbségeket ($P < 0,05$) csillaggal (*, a kontrolltól), illetve kettős kereszttel (#, a passzív érátmérőktől) jelöltük.

4.9. Az anandamid lebomlásának szerepe a dilatációban

Az anandamid arachidonsavra való lebomlását a zsírsav-amid hidroláz (FAAH) gátlásával vizsgáltuk (1 μM , URB-597, 5 percig inkubálva az anandamid hozzáadása előtt). A FAAH inhibitor jelenlétében az anandamid nem volt képes hatásait a miogén tónusra kifejteni (22. H ábra), viszont az inhibitor jelenléte az akut érátmérőre gyakorolt hatásokat (22. E ábra) nem befolyásolta. Az anandamid bomlástermék arachidonsav (1 μM) anandamidhoz hasonló hatást váltott ki az ép endotéllel rendelkező ereknél, viszont endotélfosztás után nem volt hatással az erekre (22. F, I és J ábra).

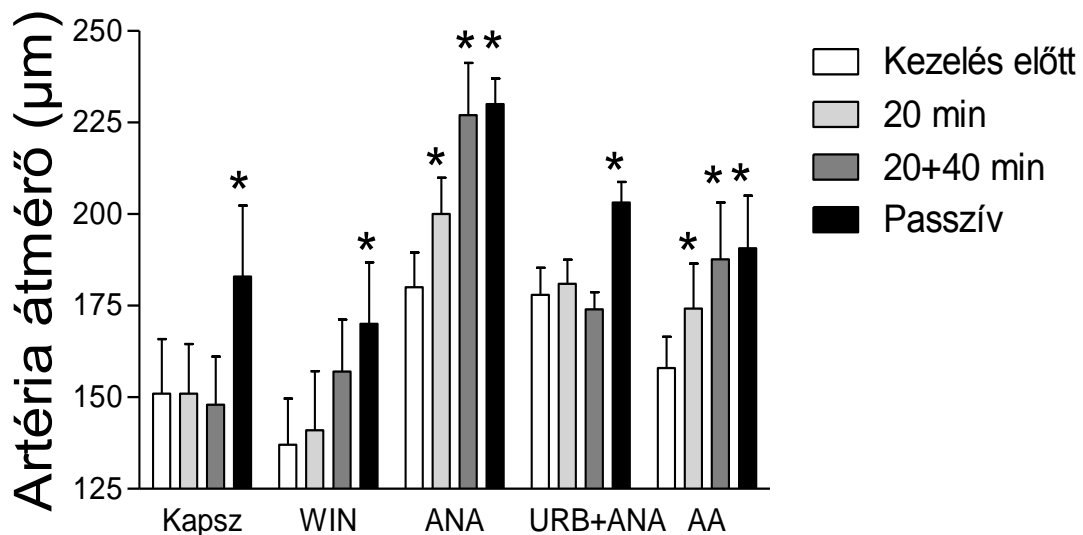
4.10. Funkcionális anandamid receptorok jelenlétének vizsgálata

Korábbi eredményeink funkcionális anandamid receptorok (különösen TRPV1) jelenlétére utaltak a kísérletekben használt vázizomerek esetében (Lizanecz és mtsai. 2006). Ezen receptorok irodalmi adatok alapján aktiválhatóak az általunk alkalmazott anandamid koncentrációk mellett. Ezen hipotézis ellenőrzésére a TRPV1 agonista kapszaicint használtuk (1 μM , 23. A és 24. ábra), amely tranziens vazokonstriktiót váltott ki a 20 perces kezelés alatt, azonban a kezelés és a 40 perces regenerációs fázis végére nem volt semmilyen hatással az erek átmérőjére. A CB1/CB2 receptor agonista WIN55-212-2 (1 μM , 23. B és 24. ábra) szintén nem okozott szignifikáns változásokat az érátmérőben.



23. ábra. Az anandamid receptorok szerepének vizsgálata a vazodilatációban

Az izolált artériákat a TRPV1 agonista kapszaicinnal (1 μM , n=9, A panel), a nem-szelktív CB agonista WIN 55-212-2-vel (1 μM , n=4, B panel), anandamiddal (30 μM , n=10, C panel), illetve arachidonsavval (1 μM , n=5, E panel) kezeltük, és az érátmérőket 10 másodpercenként mértük a 20 perces kezelés alatt. Néhány esetben az anandamid (30 μM) kezelés előtt az ereket 5 percig előkezeltük a FAAH inhibitor URB- 597-tel (1 μM , n=7, D panel). Az ábrán szereplő értékek átlagok \pm SEM.



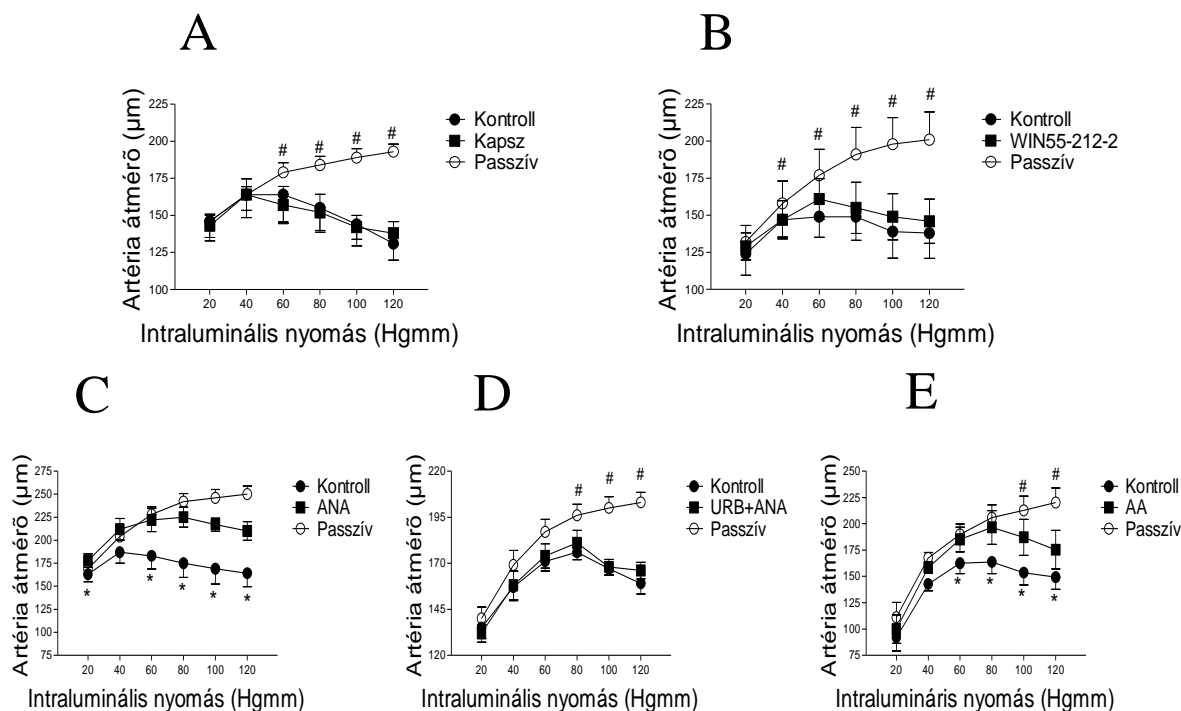
24. ábra. Az anandamid mediált hatások vizsgálata: metabolikus hatások

Az érátmérőket a kezeléseket előtt (kontroll, fehér oszlop), a 20 perces kezelés végén (20 perc, szürke oszlop) és a 40 perces regenerációs fázist követően (20+40 perc, sötétszürke oszlop) is mértük. Az arteriolák maximális dilatatív kapacitását a kísérletek végén határoztuk meg 10 μM acetilkolin jelenlétében és fekete

oszlopokkal jelöltük. Az ereket kapszaicinnel (Kapsz, 1 μ M, n=9), WIN55-212-2-vel (WIN, 1 μ M, n=4), anandamiddal (ANA, 30 μ M, n=10) és arachidonsavval (AA, 1 μ M, n=4) kezeltük. Az anandamid (30 μ M) által kiváltott válaszokat FAAH gátlószer (URB-597, 1 μ M, 5 perces előkezelés) jelenlétében is megvizsgáltuk (URB+ANA, n=7). Az ábrán szereplő értékek átlagok \pm SEM. A szignifikáns különbségeket a kontrolltól (kétutas ANOVA, Dunnett's post hoc teszt, $P < 0,05$) csillaggal (*) jelöltük.

4.11. Az anandamid lebomlásából származó arachidonsav által kiváltott hatások vizsgálata

Az anandamid útvonal további vizsgálatára a 30 μ M anandamid által kiváltott dilatációs mechanizmusokat vettük alapul (mivel ez a dózis jelentős dilatációt okozott a 20 perces kezelés alatt, 23. C és 24. ábra). Az anandamid metabolizmusának gátlása (1 μ M URB-597, 23. D és 24. ábra) teljes mértékben megakadályozta az anandamid által kiváltott dilatációt. Az arachidonsav (1 μ M, 23. E és 24. ábra) kezelés az anandamidhoz hasonló hatásokat váltott ki. A 40 perces regenerációs fázist követően is megvizsgáltuk ezen kezelések hatásait az érátmérőre (24. ábra). A TRPV1 (kapszaicin), illetve a CB1/CB2 (WIN55-212-2) receptor aktiváció a 40 perc elteltével is hatástalan volt ebben a kísérleti elrendezésben, míg az anandamid dilatatív hatását a FAAH inhibitor (URB+ANA, 24. ábra) képes volt gátolni. Az anandamid bomlásterméke, az arachidonsav az anandamidhoz hasonló hatásokat váltott ki ebben az esetben is (24. ábra). A miogén tónusra gyakorolt hatásokat is részletesen tanulmányoztuk. A TRPV1 receptor aktivációja kapszaicinnel (1 μ M, 25. A ábra), illetve a kannabinoid receptorok aktivációja WIN55-212-2-vel (1 μ M, 25. B ábra) nem volt hatással a miogén tónusra. Ezzel szemben a 30 μ M anandamid jelentősen csökkentette az erek miogén tónusát (25. C ábra), amit az URB-597 (1 μ M, 25. D ábra) előkezeléssel fel tudunk függeszteni. Az arachidonsav önmagában (1 μ M, 25. E ábra) szintén miogén tónus csökkenést okozott.

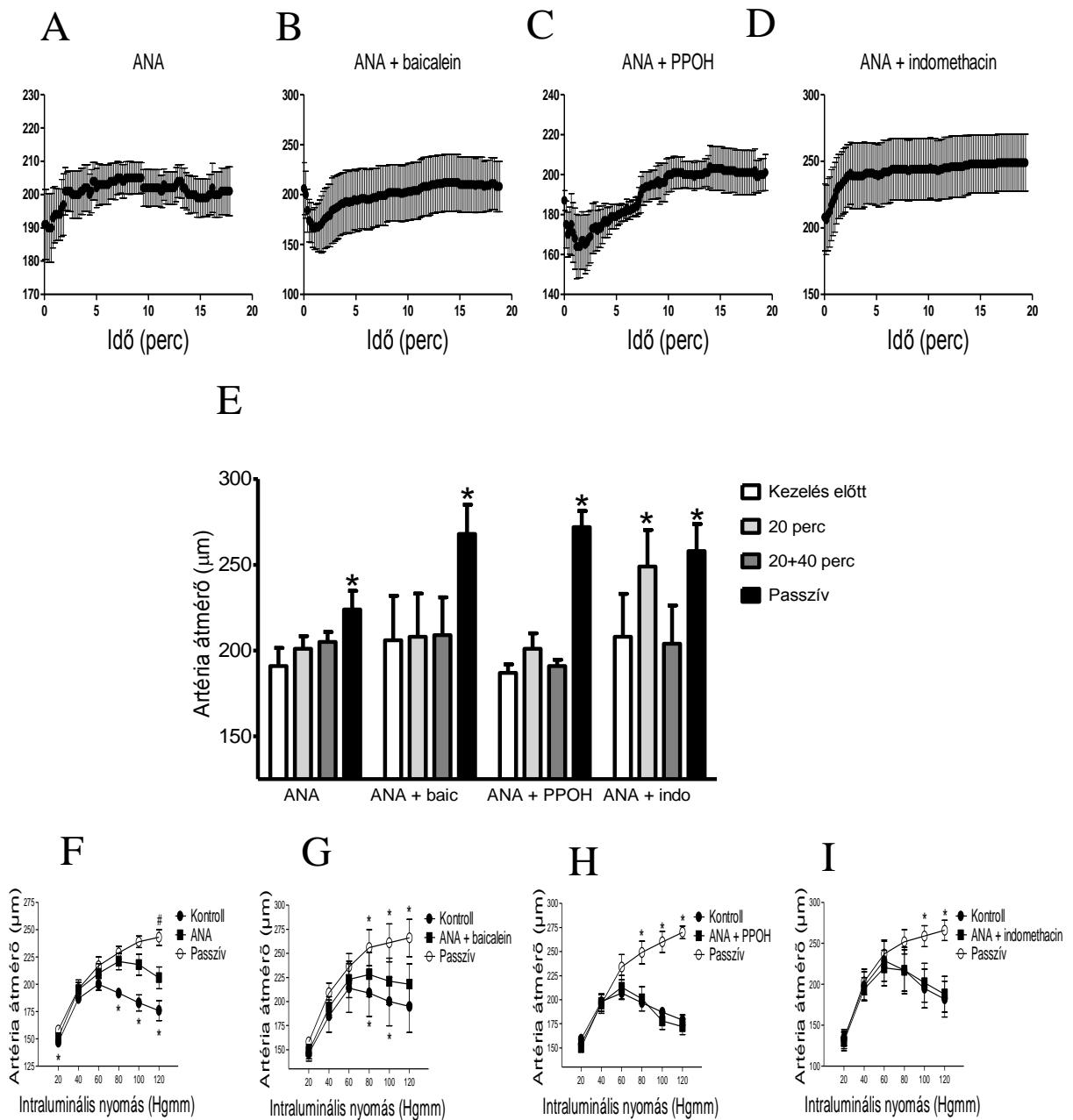


25. ábra. Az anandamid mediált hatások vizsgálata: miogén tónus

Az érátmérőket 20-120 Hgmm intraluminális nyomáson mértük a kezelés előtt (kontroll, ●), után (20 perces kezelés, majd ezt követő 40 perc regeneráció, ■), illetve a kísérletek végén Ca^{2+} hiányában (passzív, ○). Az ereket kapszaicinnal (1 μ M, n=9), WIN55-212-2-vel (1 μ M, n=4), anandamiddal (30 μ M, n=10) és arachidonsavval (1 μ M, n=5) kezeltük. A FAAH gátlás hatását (URB-597, 1 μ M, 5 perces előkezelés) is vizsgáltuk az anandamid (30 μ M) jelenlétében (URB+anandamid, n=7). Az ábrán szereplő értékek átlagok \pm SEM (E-G panel). A szignifikáns különbségeket a kezelt erek esetében (kétutas ANOVA, Dunnett's post hoc teszt, $P < 0,05$) csillaggal (*, a kontrolltól) illetve kettős kereszttel (#, a passzív érátmérőtől) jelöltük.

Eredményeink alapján feltételeztük, hogy az anandamid által kiváltott vazodilatációban és miogén tónus csökkenésben az anandamid FAAH általi metabolizmusából származó arachidonsavnak lehet szerepe. Ennek vizsgálatára az 1 μ M koncentrációjú (legkisebb dózis, ami hatásos volt a miogén tónusra, 21. és 26. A ábra) anandamidot alkalmaztuk, és gátoltuk azon lehetséges útvonalakat, amelyek szerepet játszhatnak az arachidonsav különböző dilatatív ágensekké való továbbalakulásában. A lipoxigenáz (baicalein, 1 μ M, 26. B ábra) és a citokróm P450 (PPOH, 20 μ M, 26. C ábra) útvonalak gátlása során az 1 μ M anandamid tranziens vazokonstriktiót okozott a 20 perces kezelés alatt. Ez a konstriktió a nagy koncentrációjú anandamid által okozott vazokonstriktió lefutásához volt hasonló (30 μ M, 21. C ábra). Azonban az érátmérők a 20

perces kezelés végére szignifikánsan nem különböztek a kiindulási értékektől (26. A, B és C ábra). A 40 perces regenerációs fázis végére (26. E ábra) sem alakult ki semmilyen vaszkuláris hatás, kivéve a ciklooxygenáz indometacinnal történő gátlása során (10 μ M, 26. D és E ábra). A miogén tónusra gyakorolt hatásokat vizsgálva, a baicalein nem volt képes gátolni az anandamid hatásait (26. G ábra). Ezzel ellentétben a citokróm P450 gátlása PPOH-val (20 μ M), illetve a ciklooxygenáz indometacinnal történő gátlása (10 μ M) teljesen felfüggesztette az anandamid miogén tónusra gyakorolt hatásait (26. H és I ábra).



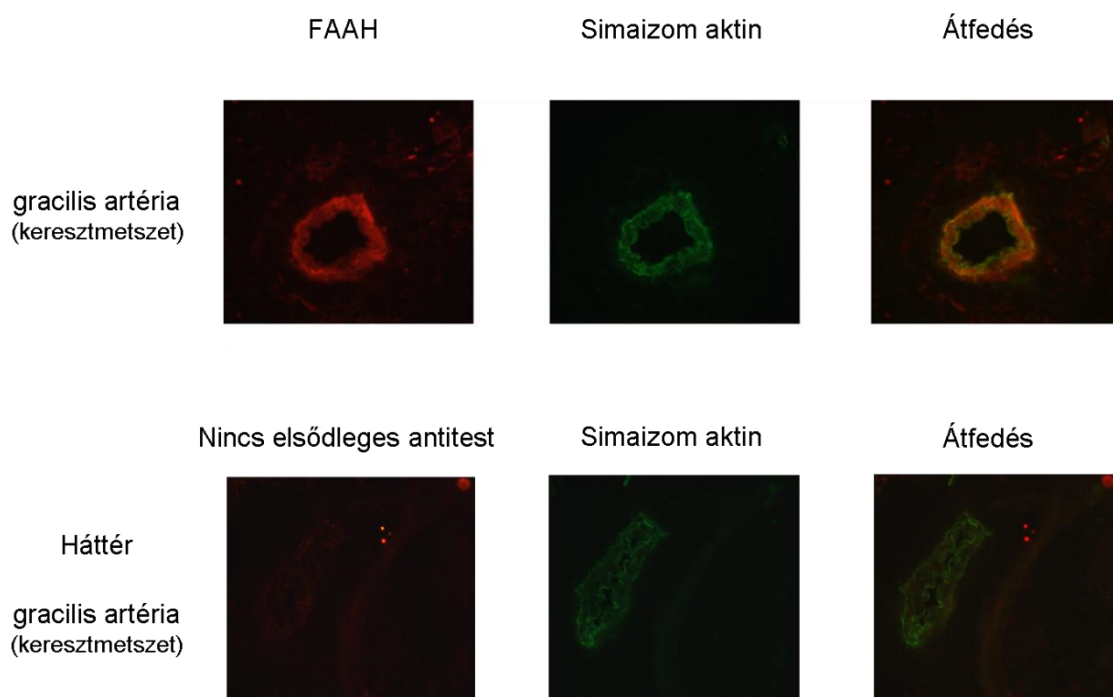
26. ábra. Az anandamid lebomlásából származó arachidonsav metabolitok hatásainak vizsgálata

Méréseink során az ereket előkezeltük (5 perc) KREBS oldattal (kontroll, ANA, A, E, és F panelek; $n=5$), lipoxigenáz inhibitorral (baicalein, $1 \mu\text{M}$, B, E és G panelek; $n=5$), citokróm P450 inhibitorral (PPOH, $20 \mu\text{M}$, C, E és H panelek; $n=5$) és ciklooxygenáz inhibitorral (indometacin, $10 \mu\text{M}$, D, E és I panelek; $n=5$) és 20 percig vizsgáltuk az érátmérő változásokat $1 \mu\text{M}$ anandamid (ANA) jelenlétében (A-D panel). Az érátmérő változások eredményeit összegezve az E panel mutatja. Az átmérőket a kísérlet elején (kontroll, üres oszlop), ANA jelenlétében a 20 perces kezelés végén (20 perc, halványszürke oszlop) és a 40 perces regenerációs fázis végén (20+40 perc, sötétszürke oszlop) is megmértük. A maximális dilatáció vizsgálatára $10 \mu\text{M}$ acetilkolint használtunk (passzív, fekete oszlop). Az ábrán szereplő értékek átlagok \pm SEM, a szignifikáns különbségeket (kétutas ANOVA, Dunnett's post hoc teszt, $P < 0.05$) a kontrollhoz képest csillaggal (*) jelöltük. Az inhibitorokkal történő kezelés hatásait a miogén tónusra is vizsgáltuk (F-I panel). 20-120 Hgmm intraluminális nyomáson mértük az érátmérőket a kezelések előtt (kontroll, ●) és a kezelések végén (20 perc és az azt követő 40 perces regeneráció, ■). A passzív érátmérőt Ca^{2+} -mentes KREBS oldatban mértük (passzív, ○). Az ábrán szereplő értékek átlagok \pm SEM. Az érátmérők szignifikáns különbségeit

(kétutas ANOVA, Dunnett's post hoc teszt, $P < 0,05$) a kezelések alatt az aktív érátmérőkhöz képest (*), a passzív átmérőkhöz pedig (#) jelöltük.

4.12. FAAH expresszió a vázizomerekben

A funkcionális kísérleteink FAAH jelenlétére utaltak a gracilis artériákon végzett kísérleteinkben. Annak vizsgálatára, hogy mely sejttípusban van jelen, immunhisztokémiai módszereket használtunk. Egy reprezentatív eredményünk látható a 27. ábrán. Eredményeink szerint FAAH expresszió a gracilis izomban található artéria simaizom rétegében mutatható ki.



27. ábra. Zsír-sav-amid hidroláz expresszió a vázizomerekben

Patkány gracilis izom festését végeztük a módszerekben leírt módon. Az ábrán látható kísérlet esetében Caymantól beszerzett nyúlban termelt FAAH ellenes antitestet (hígítás: 1:50, 10% NGS-t és 0,05% Na-azidot tartalmazó PBS-ben, 1 napig) és simaizom aktin-elleni antitestet használtunk (Sigma, hígítás: 1:100, egér, 90 percig). Az elsődleges antitestek kötődését anti-egér-FITC (Jackson, hígítás: 1:100, zöld fluoreszcencia) és Streptavidinnel konjugált Cy3 (piros fluoreszcencia) antitestekkel tettük láthatóvá. A piros szín a FAAH-t, míg a zöld szín a simaizom sejteket jelöli. Az átfedés képen látható, hogy a FAAH expressziója simaizom sejtekkel esik egybe. Kontrollként vizsgált metszeteinken a FAAH elleni antitest elhagyása miatt FAAH jelölődés nem történt.

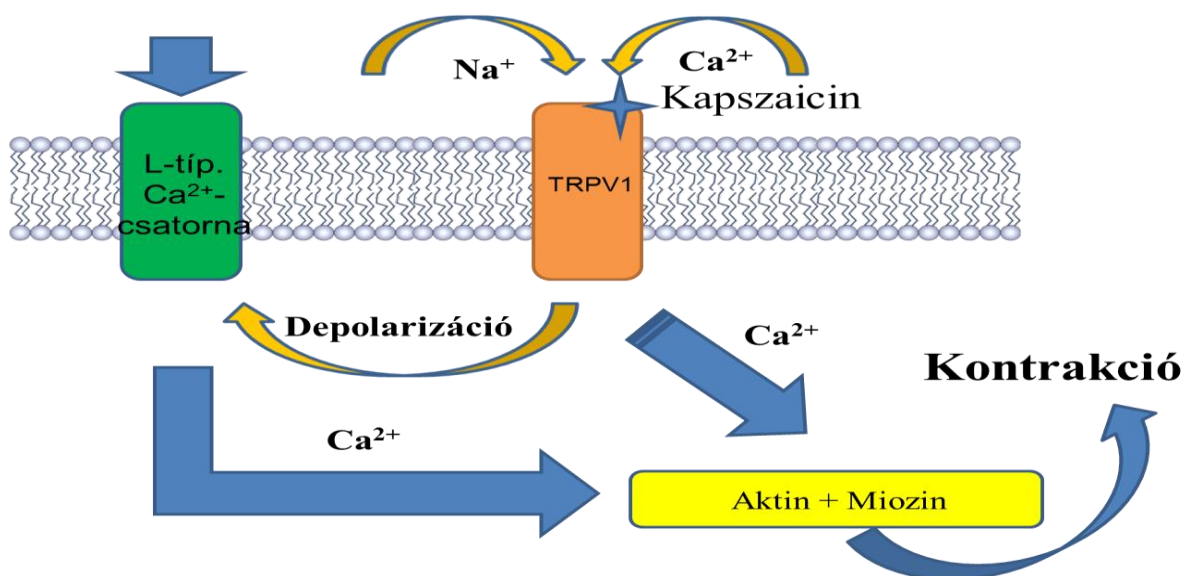
5. MEGBESZÉLÉS

5.1. A vaszkuláris TRPV1

Jelen tanulmány első részének célja a vaszkuláris TRPV1 farmakológiai és élettani jellemzése volt. Ennek során vizsgáltuk a különböző agonistákra és parciális agonistákra/antagonistákra kapott érátmérő változásokat. Eredményeink alapján elmondható, hogy jelentős farmakológiai különbségek vannak az endogéneen expresszáldó TRPV1 között. Két fő következménye lehet ezen megfigyeléseinknek. Először is a fájdalomcsillapításra szintetizált antagonisták vérkeringéssel kapcsolatos mellékhatásai elkerülhetőek. Másrészt a vaszkuláris TRPV1 új terápiás célpont lehet a vérkeringés szabályozásában.

A vaszkulárisan expresszáldó TRPV1 jellemzése a TRPV1 stimulációját követő vazokonstriktió alapján történt. Korábbi eredményeink alapján TRPV1 expressziót figyeltünk meg az általunk használt erek simaizom rétegében (Kark és mtsai. 2008). Ezen eredményeket jelen tanulmányban kiegészítettük azzal, hogy az érátmérő csökkenésével párhuzamosan nő az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció az erek falában (11. ábra); emellett ez az első alkalom, amikor az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációt közvetlenül mérni tudtuk, és bizonyítottuk a funkcionális TRPV1 jelenlétét izolált artéria simaizom sejtekben is (12. ábra). TRPV1 stimuláció következtében kialakuló vazokonstriktiót már korábban is írtak le (Molnar és mtsai. 1967; Toda és mtsai. 1972; Donnerer és mtsai. 1982; Duckles 1986; Edvinsson és mtsai. 1990), mely hatást újfent is megerősítették (Szolcsanyi és mtsai. 2001; Dux és mtsai. 2003; Scotland és mtsai. 2004; Keeble és mtsai. 2006; Lizanecz és mtsai. 2006). Érdekes, hogy korábbi tanulmányokban leírtak a TRPV1 stimulációjával kapcsolatban egy koncentráció-függő bifázisos hatást is; alacsony koncentrációjú kapszaicin dilatációt, míg a kapszaicin magasabb dózisa vazokonstriktiót okozott

(Edvinsson és mtsai. 1990; Dux és mtsai. 2003). Ez azt sugallja, hogy a dilatációért, illetve konstriktióért különböző TRPV1 populációk vagy különböző farmakológiai tulajdonságú TRPV1-ek lehetnek felelősek. A vazokonstriktió mechanizmusáról (Porszasz és mtsai. 2002; Dux és mtsai. 2003; Keeble és mtsai. 2006) korábban azt feltételezték, hogy a TRPV1 által kiváltott konstriktióban a szenzoros neuronokból felszabaduló endotelin-1-nek (Szolcsanyi és mtsai. 2001) vagy a P-anyagnak (Scotland és mtsai. 2004) lehet szerepe. Saját eredményeink arra utalnak, hogy a TRPV1 funkcionálisan expresszálódik a vázizomerek simaizom rétegében, melynek aktivációja közvetlenül vezethet intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció emelkedéshez, így vazokonstriktióhoz. Elképzelésünk szerint a TRPV1 receptor mind Ca^{2+} mind, Na^+ ionokat is beenged a sejt belsejébe. A beáramló Ca^{2+} képes aktiválni az aktin-miozin ciklust, kiváltva ezzel a kontrakciót. A belépő kationok (mind a Ca^{2+} mind a Na^+) emellett depolarizációhoz is vezethetnek, amely valószínűleg elegendő lehet a feszültségfüggő L-típusú Ca^{2+} -csatorna aktiválásához. Ezen keresztül a sejtbe további Ca^{2+} áramlik be, a kontrakció pedig tovább erősödik. A 28. ábra az általunk elképzelt mechanizmust szemlélteti.



28. ábra. A TRPV1-mediált kontrakció feltételezett mechanizmusa

5.2. A kapszaicin kiváltott konstrikió specificitása

A kapszaicin által kiváltott vazokonstrikió TRPV1 specificitását is vizsgáltuk. TRPV1 konckout egerekben a kapszaicin nem volt képes semmilyen vazoaktív hatást kifejteni (10. C ábra). Intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció méréseinkben, az érfalban a kapszaicin hatására az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció növekedését tapasztaltuk (11. ábra), mint ahogy az izolált simaizomsejtekben is (10. ábra). A 28 darab vizsgált sejtől mindössze 10 sejt válaszolt kapszaicinre, de ezen eredményeink is alátámasztják a vaszkuláris TRPV1 expresszióját a simaizomsejtek nagyjából harmadában. A receptor aktivációja az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció növekedéséhez, így vazokonstrikióhoz vezethet. Munkacsoportunk korábbi eredményei is alátámasztják a TRPV1 receptor expresszióját a gracilis izomban futó artéria simaizom rétegében (Kark és mtsai. 2008).

Ezt követően a TRPV1 farmakológiai gátlását vizsgáltuk. Kísérleteinkben a TRPV1 specifikus antagonistá AMG9810-et alkalmaztuk (ezt a vegyületet korábban már exogén és szenzoros neuronális TRPV1-en is sikerrel alkalmazták (Gavva és mtsai. 2005; Tekus és mtsai. 2010)), amely kompetitív módon gátolta a kapszaicin mediált konstrikiót. Ennek fontos következménye, hogy a fájdalomcsillapításra kifejlesztett antagonisták is befolyásolhatják a vázizom véreloszlását a vaszkuláris TRPV1 gátlásán keresztül.

A kapszaicin hatására jelentős vazokonstrikió volt megfigyelhető kanulált vázizom erek esetében (Lizanecz és mtsai. 2006; Kark és mtsai. 2008). A kapszaicin mellett számos, a kereskedelmi forgalomban elérhető agonistát is teszteltünk. Jelentős különbségek vannak a maximális hatásban, a hatékonyságban és a deszenzitizációs képességben (1. táblázat).

Agonista	DRG/CHO-TRPV1		CHO-TRPV1		Vaszkuláris TRPV1 (vazokonstrikció)				Szenzoros neuronális hatás
	K _i (kötődés)	EC ₅₀ (⁴⁵ Ca ²⁺ uptake)	EC ₅₀ (intracelluláris Ca ²⁺)	Akut deszenzitizáció	Hatékonyság	Maximális hatás	Akut deszenzitizáció	Tachyphylaxis	Szétörlés /perc
Kapszaicin	1.8±0.3 μM (Wang <i>et al.</i> , 2003)	95±8 nM (Pearce <i>et al.</i> , 2008a)	35±11 nM (Toth <i>et al.</i> , 2005b)	+ (Toth <i>et al.</i> , 2005b)	221 nM	58±7 %	+	-	15±1,2
RTX	23 pM (Lee <i>et al.</i> , 2001)	1.5±0.3 nM (Pearce <i>et al.</i> , 2008a)	81±20 pM (Toth <i>et al.</i> , 2005b)	- (Toth <i>et al.</i> , 2005b)	>10 nM	Nincs hatás 10 nM	N/A	+	20±5,1
JYL-273	11±4 nM (Lee <i>et al.</i> , 2001)	361±54 nM (Lee <i>et al.</i> , 2002)	Nincs adat	Nincs adat	>3 μM	Nincs hatás 1 μM	N/A	+	12±2,3
MSK-195	Nincs adat	162±33 nM (Lee <i>et al.</i> , 2002)	52±12 nM (Toth <i>et al.</i> , 2005b)	- (Toth <i>et al.</i> , 2005b)	120 nM	71±11 %	+	+	18±2,4
JYL-79	19±4 nM (Lee <i>et al.</i> , 2001)	58±8 nM (Lee <i>et al.</i> , 2002)	2.4±1.0 nM (Toth <i>et al.</i> , 2005b)	- (Toth <i>et al.</i> , 2005b)	3.9 nM	36±8 %	+	+	13±1,5
JYL-1511	50±17 nM (Wang <i>et al.</i> , 2003)	3.4±0.5 μM (Wang <i>et al.</i> , 2003)	Nincs adat	+ (Wang <i>et al.</i> , 2003)	N/A	Nincs hatás 1 μM	N/A	+/-	10±1,6

1. táblázat. A TRPV1 agonisták farmakológiai tulajdonságai

A táblázat bal oldali oszlopaiban az irodalmi adatokat, a jobb oldali oszlopokban (vaszkuláris/szenzoros neuronális TRPV1) saját, jelen munkában bemutatott adatainkat tüntettük fel.

Megfigyeltük, hogy néhány TRPV1 agonista (mint a RTX és JYL-273) képes deszenzitizálni a receptort, más vazoaktív hatás nélkül. A RTX viselkedése a méréseink során nem meglepő, mivel nagyon hasonló hatást már korábban leírtak a pulmonáris kemoreflex kapcsán (Szolcsanyi és mtsai. 1990). Az egyik hipotézis erre a deszenzitizációra az, hogy a TRPV1 alacsony szintű aktivációja egyes szövetekben elegendő lehet a tachyphylaxis kiváltásához anélkül, hogy jelentősen növelné az intracelluláris Ca²⁺-koncentrációt, ami a vazokonstrikció kialakulásához elengedhetetlen. Egy másik hipotézis szerint a tachyphylaxis lehet a TRPV1 RTX által történő irreverzibilis aktiválásának is következménye (Jeffrey és mtsai. 2009), ami viszont tartós Ca²⁺-beáramlással jár. A tachyphylaxis kiváltásában szerepet játszó aktiváció szintjének vizsgálatára egy parciális agonistát (JYL-1511) alkalmaztunk. Maximális hatása

agonistaként 17%-nak, míg hatékonysága 3 nM-nak adódott a TRPV1-et expresszáló CHO sejtvonalon (CHO-TRPV1) végzett kísérletekben (Wang és mtsai. 2003). A parciális agonista hatásait vaszkuláris receptorokon is megerősítettük (10% agonizmus és 70% antagonizmus).

A kapszaicin adását követően tranziens lefutású konstriktiót kaptunk, majd az erek a kezelés végére teljesen deszenzitizált állapotba kerültek. A 40 perces regenerációs fázist követően a kapszaicin képes volt az ereken vazokonstriktiót kiváltani, ami a receptorok válaszkészségének részleges helyreállítására utalt. Ezen eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a vaszkuláris simaizmokban expresszálódó TRPV1 és azon receptorok, amelyek a kapszaicin adását követően a szem irritációjaért felelősek lehetnek *in vivo* (20. ábra), különböző ligand szelektivitással rendelkeznek, mint a CHO sejtekbe transzfektált receptrok (1. táblázat) (Wang és mtsai. 2003; Toth és mtsai. 2005).

Az akut deszenzitizáció kinetikáját tekintve az agonista kezelések hatása különböző lehet. A kapszaicin esetében teljes akut deszenzitizációt kaptunk, míg más agonisták esetében (JYL-79, MSK-195) részleges deszenzitizáció volt megfigyelhető.

Számos mechanizmust feltételeznek a TRPV1 receptorok szenzitizációja és deszenzitizációja hátterében. Ezen mechanizmusok közé tartozik a PKC (Bhave és mtsai. 2003) és PKA (Bhave és mtsai. 2002) általi foszforiláció és a kalcineurin-függő defoszforiláció (Docherty és mtsai. 1996). Ami a vázizom erek TRPV1-függő vazokonstriktióját illeti, itt is a receptor foszforiláció állhat a mechanizmus hátterében. Munkacsoportunk korábbi eredményei is erre utalnak, amennyiben az anandamid (Lizanecz és mtsai. 2006) az RTX-hez és a JYL-273-hoz hasonlóan a vaszkulárisan expresszálódó TRPV1 teljes deszenzitizációját okozta. Azt is kimutattuk, hogy az anandamid által kiváltott tachyphylaxis gátolható volt protein foszfatáz 2B (kalcineurin) inhibitor jelenlétében (Lizanecz és mtsai. 2006). Összefüggésben ezzel a hipotézissel a

különböző agonisták a kalcineurin gátlására különböző módon reagáltak CHO-TRPV1 sejtvonal vizsgálata során (Pearce és mtsai. 2008), ami a receptor foszforiláció-függő szenzitivizációjának/deszzenzitivizációjának/tachyphylaxisnak ligand szelektivitására utal.

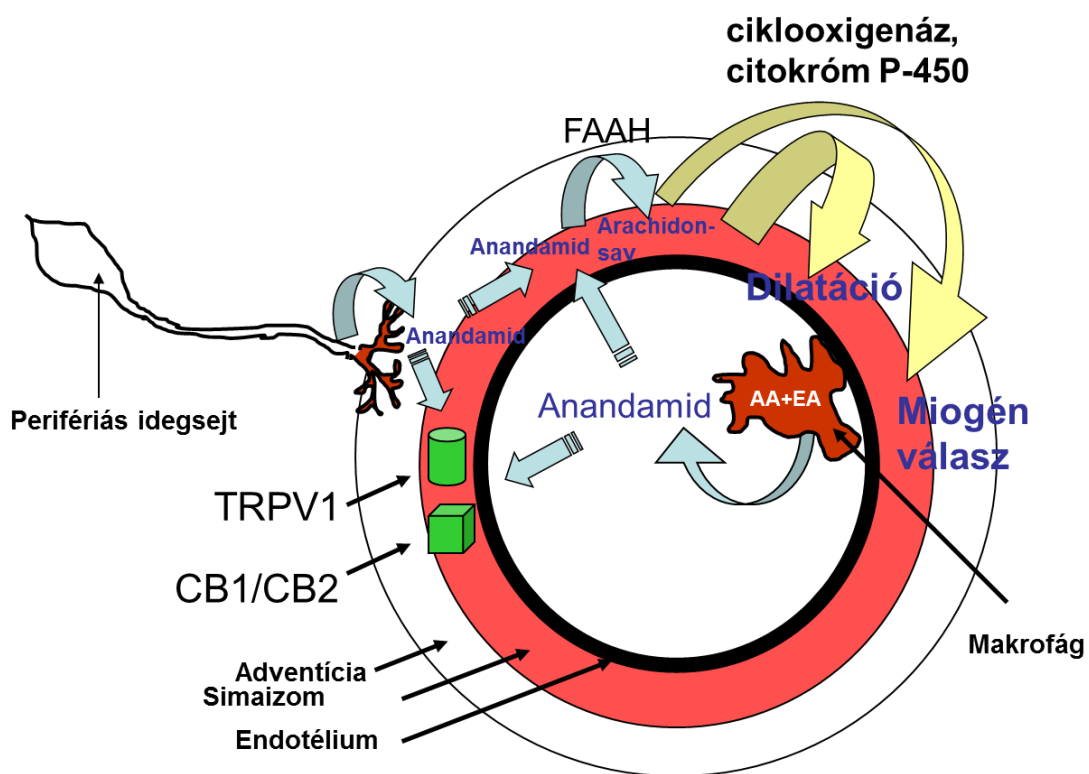
Már korábbi tanulmányunkban megfigyeltük, hogy a vázizom erek esetében a TRPV1 aktivációja jelentős vazokonstriktióval jár (Lizanecz és mtsai. 2006). A kapszaicin intra-arteriális adása is dózis-függően növelte a véráramlást patkánybőrben (vazodilatáció), míg ezzel egyidejűleg csökkentette a véráramlást a vázizomban (vazokonstriktió) (Kark és mtsai. 2008). Ez arra utal, hogy a vaszkulárisan expresszáldó TRPV1 receptor a szenzoros neuronoktól független élettani hatással rendelkezhet.

5.3. Az anandamid vaszkuláris hatásai

Behatóan vizsgáltuk az endogén TRPV1 agonistának vélt anandamid által kiváltott vaszkuláris hatásokat izolált vázizomereken. Az anandamid lebomlásának *in vivo* jelentőségét mostanában kezdik felismerni, jelentőségét kiemeli az a tény, hogy a FAAH knockout egérben az anandamid szint 15-ször magasabb, mint FAAH-val rendelkező társában, amihez csökkent nocicepció párosul (Cravatt és mtsai. 1996), azonban nincs nyilvánvaló hemodinamikai különbség a vad típusú egerekhez képest (Pacher és mtsai. 2005). Ezen megfigyelés összhangban van a FAAH gátlásával kapott eredményeinkkel (anandamid FAAH inhibitor jelentében nem volt hatással a miogén tónusra). Az URB-597 (ugyanaz a FAAH inhibitor, melyet ebben a munkában használtunk) hatására csökkentek a gyulladáscsökkentő válaszok (Holt és mtsai. 2005; Jayamanne és mtsai. 2006; Jhaveri és mtsai. 2006). A FAAH gátlásával kapott eredmények kapcsán meg kell jegyeznünk, hogy a fájdalom- és gyulladáscsökkentő hatások a magasabb anandamid szintek következményei, mely anandamid valószínűleg a CB1-en fejtette ki hatását. Mindezen kísérletekből tehát nyilvánvaló, hogy az anandamid lebomlása jelentős *in vivo* körülmények között. Az anandamid fentebb említett fájdalomcsökkentő hatásaival szemben a vaszkuláris hatások

nem csak a CB stimulációjának eredményei (Ho és mtsai. 2007). Az anandamid általában vazodilatatív hatású, azonban hatása nagyban függ a kísérletben használt erektől. Az anandamid lebomlás vaszkuláris jelentőségére utaló első közlemény több mint egy évtizede jelent meg (Ellis és mtsai. 1995). Eszerint az anandamid a központi idegrendszerben arachidonsavvá, majd prosztaglandin E₂-vé alakul át, mely molekulák indometacinnal gátolható (ciklooxygenáz mediált) dilatációt okoznak. Ezen eredményeket később kiegészítették azzal a megfigyeléssel, hogy szarvasmarhából izolált koronária gyűrűkön végzett kísérletekben az anandamid-arachidonsav átalakulás gátlása felfüggesztette a dilatációt, míg a CB gátlása nem befolyásolta azt (Pratt és mtsai. 1998). Egy további vizsgálatban az anandamid mediált vazodilatációt mind koronária (sertés és nyúl), mind karotisz (nyúl) erek esetében diclofenac (ciklooxygenáz inhibitor) függőnek találták (Fleming és mtsai. 1999). Bárány koronáriákban az anandamid dilatáció TRPV1 és CB függetlennek bizonyult, de gátolható volt FAAH inhibitorral (Grainger és mtsai. 2001). Összefoglalva, bizonyítékok vannak arra, hogy az anandamid lebomlása arachidonsavvá a vazodilatatív hatás egy fontos eleme lehet nagy átmérőjű erekben. Saját eredményeink ezt megerősítik kis átmérőjű rezisztenciaerek esetében is. Az anandamid által kiváltott vazodilatáció gátolható volt a FAAH gátlásával, és az arachidonsav az anandamidhoz hasonló hatást váltott ki, ami az anandamid arachidonsavra való lebomlására utal olyan erekben, amelyek ép endotéllel rendelkeznek. Mindazonáltal a ciklooxygenáz gátlása indometacinnal nem volt képes az anandamid által kiváltott dilatációt megszüntetni, amely a 20 perces kezelés alatt fentartott maradt, viszont a 40 perces regeneráció alatt eltűnt (24. D és E ábra). Ezek a megfigyelések a TRPV1, CB1 receptorok és arachidonsav metabolitok közötti komplex kölcsönhatást sugallják. Különösen a ciklooxygenáz gátlása a lokális arachidonsav metabolizmus irányába tolhatja el a citokróm P450 epoxigenáz útvonalat, mely dilatációt okozhat.

Az anandamid a vaszkuláris rendszerben szintetizálódhat egyebek mellett a perivaszkuláris szenzoros neuronokban, illetve makrofágokban. A szintézis után, az anandamid a környező erekhez diffundál és az érfal simaizom sejtjeiben a szabad zsírsavamid hidrolázok által arachidonsavra és etanolamidra bomlik. Az intracellulárisan felszabaduló arachidonsav aktiválja az arachidonsav érzékeny útvonalakat ezen sejtekben, ami a ciklooxygenáz és citokróm P-450 aktivációja révén értágulathoz és a miogén autoreguláció károsodásához vezet.



29. ábra. Anandamid képződése és hatásai vázizoméren

Fontos eredménye tanulmányainknak, hogy az anandamid spontán miogén tónusra gyakorolt hatását rezisztenciaereken vizsgáltuk. Az általunk használt kanulált érrendszer egyik jelentős előnye a fentebb említett kísérletekben használatos módszerekkel szemben, hogy a kis vázizomerek spontán kontrakcióval válaszolnak az intraluminális nyomás

emelkedésére, hasonlóan az *in vivo* körülményekhez, aminek fontos szerepe lehet a vérnyomás szabályozásában.

Eredményeink arra utalnak, hogy az anandamid képes gátolni/csökkenteni a miogén válaszokat (21. F, G és 22. G ábra), FAAH-függő (25. D ábra), és endotél független (22. H ábra) útvonalakon keresztül. Ezen megállapításokat a lehetséges mechanizmusok tekintetében tovább vizsgáltuk. Az arachidonsav az anandamidhoz hasonló hatásokat váltott ki ép endotéllel rendelkező ereken (26. E ábra). Funkcionális eredményeink tehát arra utalnak, hogy az anandamid lebomlásából származó arachidonsav, amely a miogén válaszokért felelős, simaizom-függő módon hat ebben a rendszerben. Ezzel összhangban a FAAH expressziója simaizom specificitást mutatott gracilis arteriolákból készített metszeteken (28. ábra). A jól ismert anandamid receptorok (TRPV1 és CB) stimulációja hatástalan volt a miogén tónusra.

Itt meg kell jegyezni azt is, hogy nem könnyű különbséget tenni a miogén jelátviteli út specifikus hatásai (nyomás okozta vazokonstriktió, amit ebben a tanulmányban is vizsgáltunk) és a dilatatív útvonalak ellentétes hatásai között. Különösen bonyolult az, amikor úgy tűnik, hogy egy ágens (mint az anandamid, 21. C ábra) az alkalmazása után közvetlenül okoz dilatációt. Mindazonáltal az anandamid kezelést követő dilatációt az endotélium közvetíti, amely dilatáció esetünkben endotél hiányában megszűnt a 20 perces kezelés alatt (22. D ábra), azonban a miogén tónusra gyakorolt hatásai megmaradtak (21. G ábra ellenben a 22. G ábrával).

Az a megállapítás, hogy az 1 μM arachidonsav esetében ellentétes hatásokat kaptunk ép endotéllel rendelkező (25. E ábra) és endotélfosztott (22. I ábra) ereken érdekesnek bizonyult. Csak spekulálni lehet, hogy az arachidonsav dózis-függően gátolhatja a miogén tónust azokban az ereken, amelyek nem rendelkeznek funkcionálisan ép endotéllel, mivel 30 μM anandamid csökkentette a miogén tónust (22. G ábra) és ez a hatás megszüntethető

volt metabolizmusának gátlásával (22. H ábra). Figyelembe kell venni továbbá azt is, hogy az anandamid a sejten belül elhelyezkedő FAAH hatására bekövetkező metabolizmusából keletkező arachidonsav más hatásokat fejthet ki, mint a plazmamembránon keresztül diffúzióval átjutó arachidonsav.

Az anandamid lebomlásából származó arachidonsav által kiváltott dilatáció ezidáig nem került tisztázásra. Eredményeink szerint fontos szerep tulajdonítható a citokróm P450 epoxigenáz és ciklooxygenáz enzimeknek. Elképzelhető, hogy mind a citokróm P450 epoxigenáz által termelt epoxi-eikosatriénsavak, mind a ciklooxygenáz által termelt prosztaciklinek szerepet játszhatnak a miogén tónus gyengítésében.

Eredményeink szerint az anandamid által kiváltott vazodilatációhoz hozzájárul a spontán miogén válasz csökkenése, mely hatásnak egyik kulcseleme az anandamid FAAH általi lebomlása arachidonsavvá. Kísérleteinkben az anandamid hatásai endotél függetlennek bizonyultak, és miogén tónus csökkentő hatása a citokróm P450 és ciklooxygenáz enzimek által katalizált folyamatnak bizonyult. A miogén válasz a szöveti perfúzióban alapvető jelentőségű (Davis és mtsai. 1999), amely felveti az aktivált neuronok és makrofágok által szintetizált anandamid (Devane és mtsai. 1992; Di Marzo és mtsai. 1996; Wagner és mtsai. 1997; Ahluwalia és mtsai. 2003) szerepét a véreloszlás szabályozásában. Az anandamid a miogén válaszokat már 1 μ M-os koncentrációban is csökkentette, ami elérheti az anandamid fiziológiás koncentrációját, ahogy azt már tenyésztett szenzoros neuronális sejteken is megfigyelték (Ahluwalia és mtsai. 2003).

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Tanulmányunkban kimutattuk, hogy a TRPV1 (nem specifikus Ca^{2+} -csatorna) aktivációja közvetlenül intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció emelkedéshez, és ezen keresztül vazokonstrikciónak vezet koronáriából izolált simaizomsejtekben, illetve izolált vázizomerek falában. A vaszkulárisan expresszálandó TRPV1 farmakológiailag különbözik a szenzoros neuronális irritációért felelős receptor populációtól. A vaszkuláris TRPV1 kompetitíven gátolható volt egy fájdalomcsillapításra fejlesztett TRPV1 antagonistával (AMG9810), ami arra utal, hogy ezen receptor stimulációja mellékhatásokkal járhat a klinikai fájdalomcsillapítás esetén. Mindemellett a vaszkuláris TRPV1 receptornak fontos fiziológiás/farmakológiás szerepe lehet a vérnyomás szabályozásában is, ami egy ígéretes új terápiás célpont.

Kimutattuk, hogy az anandamid által kiváltott vaszkuláris hatások függetlenek a vanilloid, illetve kannabinoid receptoroktól patkány gracilis artériákban. Az anandamid a vaszkuláris simaizomsejtekben arachidonsavvá metabolizálódik, amely vazodilatációt okoz (endotélium függő módon) vagy gyengíti a miogén tónust (endotélium független módon). Eredményeink azt sugallják, hogy az aktivált neuronok, vagy makrofágok által szintetizált anandamid a környező erekben FAAH által katalizált módon lebomolva aktiválhatja azok arachidonsav érzékeny jelátviteli folyamatait. Ezen arachidonsav útvonal transz-aktiváció elvezethet a vaszkuláris autoreguláció csökkenéséhez (csökkent miogén tónus), ami a szöveti véreloszlást is érintheti. Az anandamid koncentráció-függő hatásai viszont azt mutatják, hogy nemcsak a lokális szöveti véráramlás/véreloszlás szabályozásában, hanem más patofiziológiás állapotokban, mint amilyen például a gyulladáshoz kapcsolódó lokális vazodilatációban is jelentős szereppel bírhat.

7. SUMMARY

Our results indicate that TRPV1 (a nonspecific Ca^{2+} channel) activation leads to an increase in intracellular Ca^{2+} concentrations in isolated coronary smooth muscle cells and in the wall of isolated skeletal muscle arteries, resulting in vasoconstriction. The pharmacological profile of the vascular TRPV1 differs from that of the TRPV1 population responsible for sensory irritation. Arteriolar TRPV1 was inhibited by a competitive TRPV1 antagonist developed as an analgesic suggesting that vascular TRPV1 activation may represent a side effect of TRPV1 antagonists when used as analgesics *in vivo*. Moreover, vascular TRPV1 may be a new therapeutic target for the regulation of tissue blood distribution.

On the other hand, anandamide mediated vascular effects are independent of vanilloid and cannabinoid receptors in the rat gracilis artery. We propose that anandamide is metabolized to arachidonic acid in vascular smooth muscle cells. Anandamide derived arachidonic acid synthesis may directly lead to dilation (in an endothelium dependent manner) or to a blunted myogenic response (in an endothelium independent fashion) which may also contribute to physiological vasodilatation. Furthermore, these findings also suggest that anandamide synthesized in cells like neurons or activated macrophages may diffuse to the adjacent vascular beds and trans-activate the arachidonic acid pathway in the vascular wall by its FAAH mediated breakdown. This transactivation of the arachidonic acid pathway may result in an impaired vascular autoregulation and in a consequent vasodilatation affecting tissue blood distribution. Moreover, the concentration-dependent effects of anandamide observed here may suggest a significant role not only in local blood flow/distribution but also in certain vascular pathophysiological states, such as inflammation, or hypotension associated with sepsis.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- Agarwal N, Pacher P, Tegeder I, Amaya F, Constantin CE, Brenner GJ, Rubino T, Michalski CW, Marsicano G, Monory K, Mackie K, Marian C, Batkai S, Parolaro D, Fischer MJ, Reeh P, Kunos G, Kress M, Lutz B, Woolf CJ és Kuner R Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. *Nat Neurosci* 2007; 10(7): 870-879.
- Ahlquist RP A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol* 1948; 153(3): 586-600.
- Ahluwalia J, Yaqoob M, Urban L, Bevan S és Nagy I Activation of capsaicin-sensitive primary sensory neurones induces anandamide production and release. *J Neurochem* 2003; 84(3): 585-591.
- Akerman S, Kaube H és Goadsby PJ Anandamide acts as a vasodilator of dural blood vessels in vivo by activating TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol* 2004; 142(8): 1354-1360.
- Alexander SP és Kendall DA The complications of promiscuity: endocannabinoid action and metabolism. *Br J Pharmacol* 2007; 152(5): 602-623.
- Allen BG és Walsh MP The biochemical basis of the regulation of smooth-muscle contraction. *Trends Biochem Sci* 1994; 19(9): 362-368.
- Amara SG, Jonas V, Rosenfeld MG, Ong ES és Evans RM Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* 1982; 298(5871): 240-244.
- Arunlakshana O és Schild HO Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol Chemother* 1959; 14(1): 48-58.
- Bayliss WM On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *J Physiol* 1902; 28(3): 220-231.

- Bhave G, Hu HJ, Glauner KS, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS és Gereau RWt Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(21): 12480-12485.
- Bhave G, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS és Gereau RWt cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron* 2002; 35(4): 721-731.
- Biro T, Acs G, Acs P, Modarres S és Blumberg PM Recent advances in understanding of vanilloid receptors: a therapeutic target for treatment of pain and inflammation in skin. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1997; 2(1): 56-60.
- Biro T, Toth BI, Marincsak R, Dobrosi N, Geczy T és Paus R TRP channels as novel players in the pathogenesis and therapy of itch. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772(8): 1004-1021.
- Bisogno T, Melck D, Bobrov M, Gretskaya NM, Bezuglov VV, De Petrocellis L és Di Marzo V N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *Biochem J* 2000; 351 Pt 3(817-824).
- Bolz SS, Galle J, Derwand R, de Wit C és Pohl U Oxidized LDL increases the sensitivity of the contractile apparatus in isolated resistance arteries for Ca(2+) via a rho- and rho kinase-dependent mechanism. *Circulation* 2000; 102(19): 2402-2410.
- Cao T, Pinter E, Al-Rashed S, Gerard N, Hoult JR és Brain SD Neurokinin-1 receptor agonists are involved in mediating neutrophil accumulation in the inflamed, but not normal, cutaneous microvasculature: an in vivo study using neurokinin-1 receptor knockout mice. *J Immunol* 2000; 164(10): 5424-5429.

- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI és Julius D Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 2000; 288(5464): 306-313.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD és Julius D The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997; 389(6653): 816-824.
- Chen G, Suzuki H és Weston AH Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br J Pharmacol* 1988; 95(4): 1165-1174.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA és Gilula NB Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 1996; 384(6604): 83-87.
- Cristino L, Starowicz K, De Petrocellis L, Morishita J, Ueda N, Guglielmotti V és Di Marzo V Immunohistochemical localization of anabolic and catabolic enzymes for anandamide and other putative endovanilloids in the hippocampus and cerebellar cortex of the mouse brain. *Neuroscience* 2008; 151(4): 955-968.
- Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A és Sheardown SA Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 2000; 405(6783): 183-187.
- Davis MJ és Hill MA Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev* 1999; 79(2): 387-423.
- de Lanerolle P és Paul RJ Myosin phosphorylation/dephosphorylation and regulation of airway smooth muscle contractility. *Am J Physiol* 1991; 261(2 Pt 1): L1-14.

- De Petrocellis L, Bisogno T, Maccarrone M, Davis JB, Finazzi-Agro A és Di Marzo V The activity of anandamide at vanilloid VR1 receptors requires facilitated transport across the cell membrane and is limited by intracellular metabolism. *J Biol Chem* 2001; 276(16): 12856-12863.
- Denda M, Fuziwara S, Inoue K, Denda S, Akamatsu H, Tomitaka A és Matsunaga K Immunoreactivity of VR1 on epidermal keratinocyte of human skin. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285(5): 1250-1252.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A és Mechoulam R Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992; 258(5090): 1946-1949.
- Di Marzo V, Blumberg PM és Szallasi A Endovanilloid signaling in pain. *Curr Opin Neurobiol* 2002; 12(4): 372-379.
- Di Marzo V, De Petrocellis L, Fezza F, Ligresti A és Bisogno T Anandamide receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002; 66(2-3): 377-391.
- Di Marzo V, De Petrocellis L, Sepe N és Buono A Biosynthesis of anandamide and related acylethanolamides in mouse J774 macrophages and N18 neuroblastoma cells. *Biochem J* 1996; 316 (Pt 3)(977-984.
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC és Piomelli D Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 1994; 372(6507): 686-691.
- Dimopoulos GJ, Semba S, Kitazawa K, Eto M és Kitazawa T Ca²⁺-dependent rapid Ca²⁺ sensitization of contraction in arterial smooth muscle. *Circ Res* 2007; 100(1): 121-129.

- Docherty RJ, Yeats JC, Bevan S és Boddeke HW Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin-evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats. *Pflugers Arch* 1996; 431(6): 828-837.
- Donnerer J és Lembeck F Analysis of the effects of intravenously injected capsaicin in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1982; 320(1): 54-57.
- Duckles SP Effects of capsaicin on vascular smooth muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1986; 333(1): 59-64.
- Dux M, Santha P és Jancso G Capsaicin-sensitive neurogenic sensory vasodilatation in the dura mater of the rat. *J Physiol* 2003; 552(Pt 3): 859-867.
- Edvinsson L, Fredholm BB, Hamel E, Jansen I és Verrecchia C Perivascular peptides relax cerebral arteries concomitant with stimulation of cyclic adenosine monophosphate accumulation or release of an endothelium-derived relaxing factor in the cat. *Neurosci Lett* 1985; 58(2): 213-217.
- Edvinsson L, Jansen I, Kingman TA és McCulloch J Cerebrovascular responses to capsaicin in vitro and in situ. *Br J Pharmacol* 1990; 100(2): 312-318.
- Ellis EF, Moore SF és Willoughby KA Anandamide and delta 9-THC dilation of cerebral arterioles is blocked by indomethacin. *Am J Physiol* 1995; 269(6 Pt 2): H1859-1864.
- Eto M, Ohmori T, Suzuki M, Furuya K és Morita F A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization. *J Biochem* 1995; 118(6): 1104-1107.
- Fleming I, Schermer B, Popp R és Busse R Inhibition of the production of endothelium-derived hyperpolarizing factor by cannabinoid receptor agonists. *Br J Pharmacol* 1999; 126(4): 949-960.

- Folkow B Myogenic mechanisms in the control of systemic resistance. Introduction and historical background. *J Hypertens Suppl* 1989; 7(4): S1-4.
- Fowler CJ Anandamide uptake explained? *Trends Pharmacol Sci* 2012; 33(4): 181-185.
- Frisbee JC, Roman RJ, Falck JR, Krishna UM és Lombard JH 20-HETE contributes to myogenic activation of skeletal muscle resistance arteries in Brown Norway and Sprague-Dawley rats. *Microcirculation* 2001; 8(1): 45-55.
- Furchgott RF és Zawadzki JV The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288(5789): 373-376.
- Gavva NR, Bannon AW, Surapaneni S, Hovland DN, Jr., Lehto SG, Gore A, Juan T, Deng H, Han B, Klionsky L, Kuang R, Le A, Tamir R, Wang J, Youngblood B, Zhu D, Norman MH, Magal E, Treanor JJ és Louis JC The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation. *J Neurosci* 2007; 27(13): 3366-3374.
- Gavva NR, Tamir R, Qu Y, Klionsky L, Zhang TJ, Immke D, Wang J, Zhu D, Vanderah TW, Porreca F, Doherty EM, Norman MH, Wild KD, Bannon AW, Louis JC és Treanor JJ AMG 9810 [(E)-3-(4-t-butylphenyl)-N-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl)acrylamide], a novel vanilloid receptor 1 (TRPV1) antagonist with antihyperalgesic properties. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 313(1): 474-484.
- Gavva NR, Treanor JJ, Garami A, Fang L, Surapaneni S, Akrami A, Alvarez F, Bak A, Darling M, Gore A, Jang GR, Kesslak JP, Ni L, Norman MH, Palluconi G, Rose MJ, Salfi M, Tan E, Romanovsky AA, Banfield C és Davar G Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. *Pain* 2008; 136(1-2): 202-210.
- Gill CH, Randall A, Bates SA, Hill K, Owen D, Larkman PM, Cairns W, Yusaf SP, Murdock PR, Strijbos PJ, Powell AJ, Benham CD és Davies CH Characterization

- of the human HCN1 channel and its inhibition by capsazepine. *Br J Pharmacol* 2004; 143(3): 411-421.
- Grainger J és Boachie-Ansah G Anandamide-induced relaxation of sheep coronary arteries: the role of the vascular endothelium, arachidonic acid metabolites and potassium channels. *Br J Pharmacol* 2001; 134(5): 1003-1012.
- Gryglewski RJ, Moncada S és Palmer RM Bioassay of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from porcine aortic endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1986; 87(4): 685-694.
- Gunthorpe MJ, Benham CD, Randall A és Davis JB The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23(4): 183-191.
- Gunthorpe MJ, Harries MH, Prinjha RK, Davis JB és Randall A Voltage- and time-dependent properties of the recombinant rat vanilloid receptor (rVR1). *J Physiol* 2000; 525 Pt 3(747-759).
- Han SP, Naes L és Westfall TC Calcitonin gene-related peptide is the endogenous mediator of nonadrenergic-noncholinergic vasodilation in rat mesentery. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 255(2): 423-428.
- Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I és Mechoulam R 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(7): 3662-3665.
- Harris D, McCulloch AI, Kendall DA és Randall MD Characterization of vasorelaxant responses to anandamide in the rat mesenteric arterial bed. *J Physiol* 2002; 539(Pt 3): 893-902.
- Hayes P, Meadows HJ, Gunthorpe MJ, Harries MH, Duckworth DM, Cairns W, Harrison DC, Clarke CE, Ellington K, Prinjha RK, Barton AJ, Medhurst AD, Smith GD, Topp S, Murdock P, Sanger GJ, Terrett J, Jenkins O, Benham CD, Randall AD,

- Gloger IS és Davis JB Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain* 2000; 88(2): 205-215.
- Herradon E, Martin MI és Lopez-Miranda V Characterization of the vasorelaxant mechanisms of the endocannabinoid anandamide in rat aorta. *Br J Pharmacol* 2007; 152(5): 699-708.
- Hill MA, Davis MJ, Song J és Zou H Calcium dependence of indolactam-mediated contractions in resistance vessels. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 276(3): 867-874.
- Hill MA, Falcone JC és Meininger GA Evidence for protein kinase C involvement in arteriolar myogenic reactivity. *Am J Physiol* 1990; 259(5 Pt 2): H1586-1594.
- Ho WS és Randall MD Endothelium-dependent metabolism by endocannabinoid hydrolases and cyclooxygenases limits vasorelaxation to anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Br J Pharmacol* 2007; 150(5): 641-651.
- Holt S, Comelli F, Costa B és Fowler CJ Inhibitors of fatty acid amide hydrolase reduce carrageenan-induced hind paw inflammation in pentobarbital-treated mice: comparison with indomethacin and possible involvement of cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 2005; 146(3): 467-476.
- Horowitz A, Menice CB, Laporte R és Morgan KG Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev* 1996; 76(4): 967-1003.
- Hughes SR és Brain SD Nitric oxide-dependent release of vasodilator quantities of calcitonin gene-related peptide from capsaicin-sensitive nerves in rabbit skin. *Br J Pharmacol* 1994; 111(2): 425-430.
- Inoue K, Koizumi S, Fuziwara S, Denda S és Denda M Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291(1): 124-129.

- Jakab B, Helyes Z, Varga A, Bolcskei K, Szabo A, Sandor K, Elekes K, Borzsei R, Keszthelyi D, Pinter E, Petho G, Nemeth J és Szolcsanyi J Pharmacological characterization of the TRPV1 receptor antagonist JYL1421 (SC0030) in vitro and in vivo in the rat. *Eur J Pharmacol* 2005; 517(1-2): 35-44.
- Jarai Z, Wagner JA, Varga K, Lake KD, Compton DR, Martin BR, Zimmer AM, Bonner TI, Buckley NE, Mezey E, Razdan RK, Zimmer A és Kunos G Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(24): 14136-14141.
- Jayamanne A, Greenwood R, Mitchell VA, Aslan S, Piomelli D és Vaughan CW Actions of the FAAH inhibitor URB597 in neuropathic and inflammatory chronic pain models. *Br J Pharmacol* 2006; 147(3): 281-288.
- Jeffrey JA, Yu SQ, Sikand P, Parihar A, Evans MS és Premkumar LS Selective targeting of TRPV1 expressing sensory nerve terminals in the spinal cord for long lasting analgesia. *PLoS One* 2009; 4(9): e7021.
- Jhaveri MD, Richardson D és Chapman V Endocannabinoid metabolism and uptake: novel targets for neuropathic and inflammatory pain. *Br J Pharmacol* 2007; 152(5): 624-632.
- Jhaveri MD, Richardson D, Kendall DA, Barrett DA és Chapman V Analgesic effects of fatty acid amide hydrolase inhibition in a rat model of neuropathic pain. *J Neurosci* 2006; 26(51): 13318-13327.
- Jung J, Shin JS, Lee SY, Hwang SW, Koo J, Cho H és Oh U Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *J Biol Chem* 2004; 279(8): 7048-7054.
- Kark T, Bagi Z, Lizanecz E, Pasztor ET, Erdei N, Czikora A, Papp Z, Edes I, Porszasz R és Toth A Tissue-specific regulation of microvascular diameter: opposite functional

- roles of neuronal and smooth muscle located vanilloid receptor-1. *Mol Pharmacol* 2008; 73(5): 1405-1412.
- Kedei N, Szabo T, Lile JD, Treanor JJ, Olah Z, Iadarola MJ és Blumberg PM Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem* 2001; 276(30): 28613-28619.
- Keeble JE és Brain SD Capsaicin-induced vasoconstriction in the mouse knee joint: a study using TRPV1 knockout mice. *Neurosci Lett* 2006; 401(1-2): 55-58.
- Khairatkar-Joshi N és Szallasi A TRPV1 antagonists: the challenges for therapeutic targeting. *Trends Mol Med* 2009; 15(1): 14-22.
- Kim SR, Bok E, Chung YC, Chung ES és Jin BK Interactions between CB(1) receptors and TRPV1 channels mediated by 12-HPETE are cytotoxic to mesencephalic dopaminergic neurons. *Br J Pharmacol* 2008; 155(2): 253-264.
- Kitazawa T és Kitazawa K Size-dependent heterogeneity of contractile Ca²⁺-sensitization in rat arterial smooth muscle. *J Physiol* 2012;
- Laughlin MH, Bowles DK és Duncker DJ The coronary circulation in exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012; 302(1): H10-23.
- Lee J, Kang M, Shin M, Kim JM, Kang SU, Lim JO, Choi HK, Suh YG, Park HG, Oh U, Kim HD, Park YH, Ha HJ, Kim YH, Toth A, Wang Y, Tran R, Pearce LV, Lundberg DJ és Blumberg PM N-(3-acyloxy-2-benzylpropyl)-N'-[4-(methylsulfonylamino)benzyl]thiourea analogues: novel potent and high affinity antagonists and partial antagonists of the vanilloid receptor. *J Med Chem* 2003; 46(14): 3116-3126.
- Lee J, Kang SU, Lim JO, Choi HK, Jin MK, Toth A, Pearce LV, Tran R, Wang Y, Szabo T és Blumberg PM N-[4-(methylsulfonylamino)benzyl]thiourea analogues as

- vanilloid receptor antagonists: analysis of structure-activity relationships for the "C-Region". *Bioorg Med Chem* 2004; 12(2): 371-385.
- Lee J, Kim SY, Kang M, Kil MJ, Choi HK, Jin MK, Wang Y, Toth A, Pearce LV, Lundberg DJ, Tran R és Blumberg PM Analysis of structure-activity relationships with the N-(3-acyloxy-2-benzylpropyl)-N'-[4-(methylsulfonylamino)benzyl]thiourea template for vanilloid receptor 1 antagonism. *Bioorg Med Chem* 2004; 12(13): 3411-3420.
- Lee J, Kim SY, Park S, Lim JO, Kim JM, Kang M, Kang SU, Choi HK, Jin MK, Welter JD, Szabo T, Tran R, Pearce LV, Toth A és Blumberg PM Structure-activity relationships of simplified resiniferatoxin analogues with potent VR1 agonism elucidates an active conformation of RTX for VR1 binding. *Bioorg Med Chem* 2004; 12(5): 1055-1069.
- Liu B, Zhang C és Qin F Functional recovery from desensitization of vanilloid receptor TRPV1 requires resynthesis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurosci* 2005; 25(19): 4835-4843.
- Liu J, Wang L, Harvey-White J, Huang BX, Kim HY, Luquet S, Palmiter RD, Krystal G, Rai R, Mahadevan A, Razdan RK és Kunos G Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. *Neuropharmacology* 2008; 54(1): 1-7.
- Liu Y és Gutterman DD Vascular control in humans: focus on the coronary microcirculation. *Basic Res Cardiol* 2009; 104(3): 211-227.
- Lizanecz E, Bagi Z, Pasztor ET, Papp Z, Edes I, Kedei N, Blumberg PM és Toth A Phosphorylation-dependent desensitization by anandamide of vanilloid receptor-1 (TRPV1) function in rat skeletal muscle arterioles and in Chinese hamster ovary cells expressing TRPV1. *Mol Pharmacol* 2006; 69(3): 1015-1023.

- Lopez-Miranda V, Herradon E, Dannert MT, Alsasua A és Martin MI Anandamide vehicles: a comparative study. *Eur J Pharmacol* 2004; 505(1-3): 151-161.
- Machha A, Achike FI, Mohd MA és Mustafa MR Baicalein impairs vascular tone in normal rat aortas: role of superoxide anions. *Eur J Pharmacol* 2007; 565(1-3): 144-150.
- Mandadi S, Numazaki M, Tominaga M, Bhat MB, Armati PJ és Roufogalis BD Activation of protein kinase C reverses capsaicin-induced calcium-dependent desensitization of TRPV1 ion channels. *Cell Calcium* 2004; 35(5): 471-478.
- Mandadi S, Tominaga T, Numazaki M, Murayama N, Saito N, Armati PJ, Roufogalis BD és Tominaga M Increased sensitivity of desensitized TRPV1 by PMA occurs through PKCepsilon-mediated phosphorylation at S800. *Pain* 2006; 123(1-2): 106-116.
- McCormack DG, Mak JC, Minette P és Barnes PJ Muscarinic receptor subtypes mediating vasodilation in the pulmonary artery. *Eur J Pharmacol* 1988; 158(3): 293-297.
- McIntyre P, McLatchie LM, Chambers A, Phillips E, Clarke M, Savidge J, Toms C, Peacock M, Shah K, Winter J, Weerasakera N, Webb M, Rang HP, Bevan S és James IF Pharmacological differences between the human and rat vanilloid receptor 1 (VR1). *Br J Pharmacol* 2001; 132(5): 1084-1094.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR és et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 1995; 50(1): 83-90.
- Mezey E, Toth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, Guo A, Blumberg PM és Szallasi A Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and

- VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(7): 3655-3660.
- Milman G, Maor Y, Abu-Lafi S, Horowitz M, Gallily R, Batkai S, Mo FM, Offertaler L, Pacher P, Kunos G és Mechoulam R N-arachidonoyl L-serine, an endocannabinoid-like brain constituent with vasodilatory properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(7): 2428-2433.
- Minke B The history of the Drosophila TRP channel: the birth of a new channel superfamily. *J Neurogenet* 2010; 24(4): 216-233.
- Mohapatra DP és Nau C Regulation of Ca²⁺-dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2005; 280(14): 13424-13432.
- Mohapatra DP, Wang SY, Wang GK és Nau C A tyrosine residue in TM6 of the Vanilloid Receptor TRPV1 involved in desensitization and calcium permeability of capsaicin-activated currents. *Mol Cell Neurosci* 2003; 23(2): 314-324.
- Molnar J és Gyorgy L Pulmonary hypertensive and other haemodynamic effects of capsaicin in the cat. *Eur J Pharmacol* 1967; 1(2): 86-92.
- Moran MM, McAlexander MA, Biro T és Szallasi A Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2011; 10(8): 601-620.
- Mukhopadhyay S, Chapnick BM és Howlett AC Anandamide-induced vasorelaxation in rabbit aortic rings has two components: G protein dependent and independent. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282(6): H2046-2054.
- Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H és Tominaga M Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues. *J Biol Chem* 2002; 277(16): 13375-13378.

- O'Sullivan SE, Kendall DA és Randall MD Vascular effects of delta 9-tetrahydrocannabinol (THC), anandamide and N-arachidonoyldopamine (NADA) in the rat isolated aorta. *Eur J Pharmacol* 2005; 507(1-3): 211-221.
- O'Sullivan SE, Kendall DA és Randall MD Heterogeneity in the mechanisms of vasorelaxation to anandamide in resistance and conduit rat mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* 2004; 142(3): 435-442.
- Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T és Ueda N Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem* 2004; 279(7): 5298-5305.
- Osol G, Laher I és Cipolla M Protein kinase C modulates basal myogenic tone in resistance arteries from the cerebral circulation. *Circ Res* 1991; 68(2): 359-367.
- Pacher P, Batkai S, Osei-Hyiaman D, Offertaler L, Liu J, Harvey-White J, Brassai A, Jarai Z, Cravatt BF és Kunos G Hemodynamic profile, responsiveness to anandamide, and baroreflex sensitivity of mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289(2): H533-541.
- Patel PN és Pathak R Rimonabant: a novel selective cannabinoid-1 receptor antagonist for treatment of obesity. *Am J Health Syst Pharm* 2007; 64(5): 481-489.
- Paus R, Schmelz M, Biro T és Steinhoff M Frontiers in pruritus research: scratching the brain for more effective itch therapy. *J Clin Invest* 2006; 116(5): 1174-1186.
- Pearce LV, Toth A, Ryu H, Kang DW, Choi HK, Jin MK, Lee J és Blumberg PM Differential modulation of agonist and antagonist structure activity relations for rat TRPV1 by cyclosporin A and other protein phosphatase inhibitors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2008; 377(2): 149-157.
- Pedersen SF, Owsianik G és Nilius B TRP channels: an overview. *Cell Calcium* 2005; 38(3-4): 233-252.

- Piomelli D, Tarzia G, Duranti A, Tontini A, Mor M, Compton TR, Dasse O, Monaghan EP, Parrott JA és Putman D Pharmacological profile of the selective FAAH inhibitor KDS-4103 (URB597). *CNS Drug Rev* 2006; 12(1): 21-38.
- Piper AS, Yeats JC, Bevan S és Docherty RJ A study of the voltage dependence of capsaicin-activated membrane currents in rat sensory neurones before and after acute desensitization. *J Physiol* 1999; 518 (Pt 3)(721-733.
- Porszasz R, Porkolab A, Ferencz A, Pataki T, Szilvassy Z és Szolcsanyi J Capsaicin-induced nonneural vasoconstriction in canine mesenteric arteries. *Eur J Pharmacol* 2002; 441(3): 173-175.
- Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB és Felder CC Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 301(3): 1020-1024.
- Pratt PF, Hillard CJ, Edgemond WS és Campbell WB N-arachidonylethanolamide relaxation of bovine coronary artery is not mediated by CB1 cannabinoid receptor. *Am J Physiol* 1998; 274(1 Pt 2): H375-381.
- Ralevic V, Kendall DA, Jerman JC, Middlemiss DN és Smart D Cannabinoid activation of recombinant and endogenous vanilloid receptors. *Eur J Pharmacol* 2001; 424(3): 211-219.
- Randall MD és Kendall DA Involvement of a cannabinoid in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated coronary vasorelaxation. *Eur J Pharmacol* 1997; 335(2-3): 205-209.
- Ray AM, Benham CD, Roberts JC, Gill CH, Lanneau C, Gitterman DP, Harries M, Davis JB és Davies CH Capsazepine protects against neuronal injury caused by oxygen glucose deprivation by inhibiting I(h). *J Neurosci* 2003; 23(31): 10146-10153.

- Ross RA Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol* 2003; 140(5): 790-801.
- Ross RA, Gibson TM, Brockie HC, Leslie M, Pashmi G, Craib SJ, Di Marzo V és Pertwee RG Structure-activity relationship for the endogenous cannabinoid, anandamide, and certain of its analogues at vanilloid receptors in transfected cells and vas deferens. *Br J Pharmacol* 2001; 132(3): 631-640.
- Scotland RS, Chauhan S, Davis C, De Felipe C, Hunt S, Kabir J, Kotsonis P, Oh U és Ahluwalia A Vanilloid receptor TRPV1, sensory C-fibers, and vascular autoregulation: a novel mechanism involved in myogenic constriction. *Circ Res* 2004; 95(10): 1027-1034.
- Simon GM és Cravatt BF Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway. *J Biol Chem* 2006; 281(36): 26465-26472.
- Szallasi A és Blumberg PM Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* 1999; 51(2): 159-212.
- Szallasi A, Cortright DN, Blum CA és Eid SR The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6(5): 357-372.
- Szolcsanyi J Antidromic vasodilatation and neurogenic inflammation. *Agents Actions* 1988; 23(1-2): 4-11.
- Szolcsanyi J, Oroszi G, Nemeth J, Szilvassy Z, Blasig IE és Tosaki A Functional and biochemical evidence for capsaicin-induced neural endothelin release in isolated working rat heart. *Eur J Pharmacol* 2001; 419(2-3): 215-221.

- Szolcsanyi J, Szallasi A, Szallasi Z, Joo F és Blumberg PM Resiniferatoxin: an ultrapotent selective modulator of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 255(2): 923-928.
- Tekus V, Bolcskei K, Kis-Varga A, Dezsi L, Szentirmay E, Visegrady A, Horvath C, Szolcsanyi J és Petho G Effect of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptor antagonist compounds SB705498, BCTC and AMG9810 in rat models of thermal hyperalgesia measured with an increasing-temperature water bath. *Eur J Pharmacol* 2010; 641(2-3): 135-141.
- Toda N, Usui H, Nishino N és Fujiwara M Cardiovascular effects of capsaicin in dogs and rabbits. *J Pharmacol Exp Ther* 1972; 181(3): 512-521.
- Tominaga M és Tominaga T Structure and function of TRPV1. *Pflugers Arch* 2005; 451(1): 143-150.
- Toth A, Blumberg PM és Boczan J Anandamide and the vanilloid receptor (TRPV1). *Vitam Horm* 2009; 81(389-419).
- Toth A, Boczan J, Kedei N, Lizanecz E, Bagi Z, Papp Z, Edes I, Csiba L és Blumberg PM Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 2005; 135(1-2): 162-168.
- Toth A, Kedei N, Wang Y és Blumberg PM Arachidonyl dopamine as a ligand for the vanilloid receptor VR1 of the rat. *Life Sci* 2003; 73(4): 487-498.
- Toth A, Wang Y, Kedei N, Tran R, Pearce LV, Kang SU, Jin MK, Choi HK, Lee J és Blumberg PM Different vanilloid agonists cause different patterns of calcium response in CHO cells heterologously expressing rat TRPV1. *Life Sci* 2005; 76(25): 2921-2932.

- Wagner JA, Varga K, Ellis EF, Rzigalinski BA, Martin BR és Kunos G Activation of peripheral CB1 cannabinoid receptors in haemorrhagic shock. *Nature* 1997; 390(6659): 518-521.
- Wagner JA, Varga K, Jarai Z és Kunos G Mesenteric vasodilation mediated by endothelial anandamide receptors. *Hypertension* 1999; 33(1 Pt 2): 429-434.
- Wang Y, Toth A, Tran R, Szabo T, Welter JD, Blumberg PM, Lee J, Kang SU és Lim JO High-affinity partial agonists of the vanilloid receptor. *Mol Pharmacol* 2003; 64(2): 325-333.
- Xiang L, Naik JS és Hester RL Functional vasodilation in the rat spinotrapezius muscle: role of nitric oxide, prostanoids and epoxyeicosatrienoic acids. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008; 35(5-6): 617-624.
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D és Hogestatt ED Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 1999; 400(6743): 452-457.

9. TÁRGYSZAVAK

Akut deszenzitizáció

Anandamid

Arachidonsav

Endotél

Farmakológiai tulajdonságok

Intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció

TRPV1

Miogén tónus

Szabad zsírsav-amid hidrolázok

Tachyphylaxis

Vaszkuláris autoreguláció

Vazodilatáció

Vázizom arteriola

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretnék hálás köszönetet mondani Tóth Attila témavezetőmnek, hogy számos elméleti és gyakorlati tanáccsal segítette és irányította munkámat.

Köszönöm a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Kardiológiai Intézet és Klinikai Fiziológiai Tanszék munkatársainak, kiemelten Prof. Dr. Édes István Igazgató Úrnak és Prof. Dr. Papp Zoltán Tanszékvezető Úrnak, hogy munkámat támogatták és lehetővé tették számomra, hogy a Klinikai Fiziológiai Tanszéken végezzem tudományos kutatásaimat.

Szeretném megköszönni a Klinikai Fiziológiai Tanszék minden dolgozójának a munkámhoz nyújtott segítséget. Külön köszönet Pásztorné Tóth Enikőnek és Mányiné Sikett Ivettának a laboratóriumi munkában nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozom Rutkai Ibolyának a mindenkori támogatásáért, továbbá Bakó Péternek és Csípő Tamásnak a kísérletes munka során nyújtott segítségükért.

Támogatás:

Jelen munka a TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007, TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 és a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045 támogatásával készült.

11. FÜGGELÉK

A függelék az értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények különlenyomatait tartalmazza:

Iktatószám: DEENKÉTK/298/2012.

Tételszám:

Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Czíkora Ágnes

Neptun kód: W82YSF

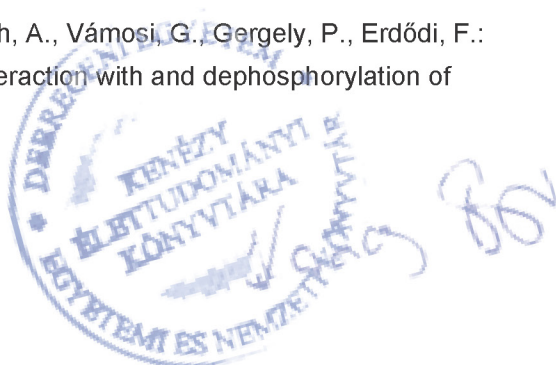
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Czíkora, Á.**, Lizanecz, E., Boczán, J., Daragó, A., Papp, Z., Édes, I., Tóth, A.: Vascular metabolism of anandamide to arachidonic acid affects myogenic constriction in response to intraluminal pressure elevation.
Life Sci. 90 (11-12), 407-415, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2011.12.016>
IF:2.527 (2011)
2. **Czíkora, Á.**, Lizanecz, E., Bakó, P., Rutkai, I., Ruzsnavszky, F., Magyar, J., Pórszász, R., Kark, T., Facskó, A., Papp, Z., Édes, I., Tóth, A.: Structure-activity relationships of vanilloid receptor agonists for arteriolar TRPV1.
Br. J. Pharmacol. 165 (6), 1801-1812, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01645.x>
IF:4.409 (2011)

További Közlemények

3. Kolozsvári, B., Bakó, É., Bécsi, B., Kiss, A., **Czíkora, Á.**, Tóth, A., Vámosi, G., Gergely, P., Erdődi, F.: Calcineurin regulates endothelial barrier function by interaction with and dephosphorylation of myosin phosphatase.
Cardiovasc. Res. Epub ahead of print (2012)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvs255>
IF:6.064 (2011)



4. Szántó, M., Rutkai, I., Hegedűs, C., **Czikora, Á.**, Rózsahegyi, M., Kiss, B., Virág, L., Gergely, P., Tóth, A., Bai, P.: Poly(ADP-ribose) polymerase-2 depletion reduces doxorubicin-induced damage through SIRT1 induction.

Cardiovasc. Res. 92 (3), 430-438, 2011.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvr246>

IF:6.064

5. Kark, T., Bagi, Z., Lizanecz, E., Pásztorné Tóth, E., Erdei, N., **Czikora, Á.**, Papp, Z., Édes, I., Pórszász, R., Tóth, A.: Tissue-specific regulation of microvascular diameter: Opposite functional roles of neuronal and smooth muscle located vanilloid receptor-1.

Mol. Pharmacol. 73 (5), 1405-1412, 2008.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1124/mol.107.043323>

IF:4.711

Összesített impakt faktor: 23.775

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 6.936

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

Debrecen, 2012.10.11

