

**EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

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

**Czikora Ágnes**

**Témavezető: Dr. Tóth Attila**



**DEBRECENI EGYETEM**

**LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2012**

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

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Czikora Ágnes okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája (kardiovaszkuláris megbetegedések programja) keretében

Témavezető: Dr. Tóth Attila

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus  
tagok: Dr. Szabó Tamás, Ph.D.  
Dr. Balla András, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2012. november 20. 11:00

Az értekezés bírálói:

Dr. Helyes Zsuzsanna, az MTA doktora  
Dr. Bíró Tamás, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus  
tagok: Dr. Szabó Tamás, Ph.D.  
Dr. Balla András, Ph.D.  
Dr. Helyes Zsuzsanna, az MTA doktora  
Dr. Bíró Tamás, az MTA doktora

**Az értekezés védésének időpontja:** 2012. november 20. 13:00 I.sz. Belgyógyászati Klinika

# 1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

## 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. Strukturális sajátosságai alapján a kapszaicin receptor homológiát mutatott a *Drosophila melanogaster* retinájában található TRP (tranzient receptor potential) fehérjével, a kapszaicin receptor így a TRP receptor család egyik altípusának tekinthető, ezért a szakirodalomban TRPV1-nek (tranzient receptor potential vanilloid-1) nevezik. A tranziens receptor potenciál (TRP) szuperfamíliának körülbelül 28 tagja van emlősökben, ezek 6 alcsoportba oszthatók 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). 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. Ez a receptor 838 aminosavból álló, 95 kDa nagyságú fehérje, amit 6  $\beta$ -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 protein kináz A (PKA) foszforilációs helyek. Továbbá 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), amelynek fontos szerepe van a receptor  $Ca^{2+}$ -függő deszenzitizációjában.

A receptor szenzitizációjában fontos szerepet kap a PKA, protein kináz C (PKC) és a  $Ca^{2+}$ /kalmodulin-függő kináz II (CAMKII) általi foszforiláció.

A TRPV1 stimulációját követően a sejten belüli  $\text{Ca}^{2+}$  szint megnő, 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  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációt pedig alacsony szinten tartja. Ebben az akut deszenzitizációban főleg a protein foszfatáz 2B-nek (calcineurin) igazolták a szerepét, mely enzim képes a TRPV1-et defoszforilálni.

## **A TRPV1 élettani jelentősége**

A TRPV1 megtalálható a szenzoros C és A- $\delta$  neuronokban. 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.

A szenzoros idegek végződéseiben expresszáldó TRPV1 aktivációja  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Na}^+$  ionok sejtekbe történő beáramlásával jár. Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció emelkedése a perifériás TRPV1 aktivációja esetén helyi, úgynevezett „szenzoros efferens” hatásokhoz vezet. A folyamat során az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció emelkedése az idegvégződésekben található neurotranszmittereket (CGRP és a SP) tartalmazó vezikulák kiürüléséhez vezet. Ezen neurotranszmitterek az erek endotéljéhez diffundálnak és a sejtfelszíni receptorokhoz kötődve aktiválják az endoteliális nitrogén-monoxid szintáz (NOS). A képződő NO a simaizom sejtekben a szolubilis guanilát cikláz aktiválásával emelkedett cGMP szinthez és ezen keresztül relaxációhoz vezet. A TRPV1 közvetített vazodilatáció tehát ennek megfelelően endotél és NO szintézis függő. A vazodilatáció különböző vérerekben figyelhető meg, mint a mezenteriális, hepaticus, baziláris, durális és meningeális artériákban.

A TRPV1 expresszió tekintetében az utóbbi években meglepő eredmények születtek, melyek arra utalnak, hogy a TRPV1 korántsem csak a szenzoros neuronokban expresszáldódik. Így kimutatták a TRPV1 jelenlétét a központi idegrendszer számos sejt típusában (neuronok,

asztrociták, periciták). Egyre több információ lát arról is napvilágot, hogy ezen nem szenzoros neuronokban expresszáldó TRPV1 funkcionális jelentőséggel bírhat. Immunhisztokémiai vizsgálatok segítségével kimutatták humán bőr epidermiszén és tenyésztett epidermális keratinocitákon, amit RT-PCR módszerrel alá is támasztottak. 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 gyulladásos folyamatainak kialakításában, illetve szabályozásában. A receptor farmakológiai befolyásolása pedig különböző bőrbetegségek kezelésében lehet fontos.

## **A TRPV1 vaszkuláris expressziója és stimulációjának hatásai**

A kapszaicin kiváltotta *in vivo* vazokonstriktiót számos értípus esetében már évtizedekkel ezelőtt is leírták. Vazokonstriktió volt megfigyelhető kutya mezenterialis, koronária, vázizom és durális erekben is, későbbi adatok alapján.

A kapszaicin kiváltott vazokonstriktió nem egyetlen szervben és nem faj specifikusan figyelhető meg. A megfigyelt konstriktió mechanizmusára több lehetséges magyarázatot javasoltak. Ennek alapján felmerült a TRPV1 stimulációt követő, vazokonstriktív anyagok (endothelin, illetve SP) felszabadulása, illetve pontosabban nem karakterizált simaizom függő folyamatok aktivációja. Saját eredményeink viszont arra utalnak, hogy a TRPV1 funkcionálisan expresszáldik a vázizomerek simaizom rétegében és aktivációja közvetlenül vezethet intracelluláris  $Ca^{2+}$  szintemelkedéshez és vazokonstriktióhoz.

Korábbi eredményeink szerint a TRPV1 expresszáldhat a vaszkuláris szövetekben is. Azt találtuk, hogy a TRPV1 stimuláció a patkány bőrben vazodilatációt váltott ki, míg az izomban vazokonstriktiót. 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 vasoaktív hatásokat ugyanazon értípusban is. Így például mezenteriális erek esetében egyaránt leírtak vazokonstriktiót és vazodilatációt. Ezen bifázisos hatásokat izolált vázizom erek esetében is megfigyelték. 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. A kifejlődő válasz ezen kettős hatás eredménye.

## **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 jegyeztek be ebben a vonatkozásban. A TRPV1 gátlása klinikai fázis I és II vizsgálatok szintjére jutott a krónikus gyulladásos fájdalom és a migrén kezelésében. Emellett más fájdalom típusokban 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 hatás mellett az is nyilvánvaló, hogy a TRPV1 gátlása terápiás jelentőségű lehet az inkontinencia és a krónikus köhögés esetében is. A TRPV1-gátlás fájdalomcsillapító hatását TRPV1 knockout egérmodellekben kapott eredmények is alátámasztják. Amellett, hogy a TRPV1 antagonisták mind állatmodellekben, mind klinikai vizsgálatokban sikeresnek bizonyultak, bizonyos TRPV1 antagonisták alkalmazása komoly hipertermiát okozott. A hipertermia kialakulásának hátterében valószínűleg a TRPV1 hőmérséklet szabályozásban betöltött szerepe állhat. Ugyanakkor az a tény, hogy nem minden fájdalom csökkentésére alkalmas TRPV1 antagonisták okozott hipertermiát 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  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - és  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornákat, továbbá a humán HCN1 csatornát is.

Saját tanulmányunkban az AMG9810 antagonistát alkalmaztuk. Korábban már igazolták ezen vegyület hatásait patkány és humán TRPV1 receptorokra és ennek során kompetitív antagonizmust írtak le.

A kapszaicin kémiai szerkezetét tekintve három régióra osztható. 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. 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

Az ultrapotens TRPV1 agonista RTX szerkezete ugyanakkor rámutatott, hogy a „C” régióban is lehetnek további TRPV1 kötőhelyek, melyek megfelelő viszonyok mellett (például a RTX szerkezetében) a TRPV1-hez való affinitást akár három nagyságrenddel is növelhetik. Ezen tulajdonság kiaknázását RTX-szerű szerkezetek „C” régióba történő beépítésével is megpróbálták vizsgálni.

## **Az anandamid és hatásai**

Az anandamidot 20 éve olyan agyi molekulaként azonosították, amely képes a kannabinoid receptorokhoz kötődni. Az anandamid (N-arachidonil-etanolamin) mellett a másodikként leírt 2-arachidonil-glicerin (2-AG) a legismertebb endogén kannabinoid molekula. Rajtuk kívül számos, a klasszikus kannabinoid receptorokon ható, illetve az endokannabinoidokkal kémiai rokon bioaktív lipidet sikerült azonosítani az agyban. Későbbi kutatások ezt megerősítették, sőt azt is kimutatták, hogy az anandamid nemcsak a kannabinoid receptorokat (CB1 és CB2), hanem a TRPV1-et is aktiválja, és számos más fehérje aktivitását is befolyásolja. Hatékonyságát tekintve azonban jelentős különbségeket találtak: egyes kísérleti rendszerekben teljes, míg másokban részleges agonistának bizonyult így a TRPV1 esetében is.

## Az anandamid szintézise és lebomlása

Az anandamid kémiailag arachidonil-etanolamid, vagyis az etanolamin arachidonsavval képzett amidja. Az anandamid felépítése alapján az N-acil-etanolaminok (NAE) családjába tartozik. Számos más bioaktív lipidszármazék mellett, amelyekkel közös metabolikus útvonalakon szintetizálódik, a lebontását is a rokon molekulákat is degradáló enzimek végzik az idegsejtekben. Az anandamid a membránokban jelen lévő N-acil-foszfatidil-etanolaminok (NAPE) hidrolízisével keletkezik egy specifikus foszfolipáz D (NAPE-PLD) segítségével.

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. 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), valamint különböző oxigenázok gyorsan átalakítják.

Az arachidonsav a szervezetben linolsavból és linolénsavból szintetizálódik. Emlős sejtekben az arachidonsav szinte kizárólag a glicerofoszfolipidek 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 foszfolipáz A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) enzimek hatására hidrolízissel szabadul fel foszfolipidekből. A nagy molekulatömegű PLA<sub>2</sub> specifikus, csak az arachidonsavat tartalmazó foszfolipidek hidrolízisét katalizálja az intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-koncentráció növekedése esetén. A Ca<sup>2+</sup>-koncentráció emelkedés a PLA<sub>2</sub> plazmamembránhoz (és így a szubsztrátjához) történő transzlokációjához szükséges. Az arachidonsav felszabadulás másik útjához két enzim, a foszfolipáz C (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.

## **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, illetve ötször gyengébb, mint a kapszaicin affinitása a receptorhoz. Általánosságban elmondható, hogy az anandamid hatékonysága a TRPV1 iránt szövet-, expresszió- és fajfüggő. Az anandamid a TRPV1 mediált válaszok részleges aktivátora lehet, ha a receptor expressziója alacsony, míg teljes aktivátora, ha a receptor expressziója magas a szövetekben.

## **Az anandamid vazóaktív hatásai**

Az anandamid fájdalomcsökkentő hatása mellett általánosságban elmondhatjuk, hogy vazodilatációt okoz. Az anandamid által kiváltott vazodilatáció során a perivaszkuláris szenzoros neuronokban aktiválódik a TRPV1 receptor, aminek következtében CGRP szabadul fel. Szintén vazodilatációt okoz a trigeminovaszkuláris rendszerben expresszálandó TRPV1 aktiválásával, ami független a CB1 receptoroktól. Ezen vazodilatatív hatások azonban nagymértékben különböznek az érrendszer különböző szakaszain. A nagy artériákban bizonyos esetekben jelentős, míg más esetekben csupán kismértékű relaxáció volt megfigyelhető. Fontos megjegyezni, hogy a dilatatív hatások sokszor a CB és TRPV1 receptoroktól is függetlenül jelentkeztek.

## 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. A kísérleti protokollok előtt az állatokat nátrium pentobarbital (50 mg/ttkg) intraperitoneális adásával altattuk el. Ezután az állatokon eutanáziát végeztünk.

#### **Kísérletes állatmodellek**

Kísérleteinkhez hím Wistar patkányokat használtunk, amelyeket normál tápon tartottunk (CRLT/N táp). A patkányok mellett 12-14 hetes knockout TRPV1<sup>-/-</sup> (C57BL/6-TRPV1<sup>tm1Jlul</sup>/J) és vad típusú (C57BL/6) egereket is használtunk.

#### **Izolált mikroértechnika**

Méréseinket patkány vázizomban (*musculus gracilis*) futó artériákon végeztük. A patkányok gracilis izmát kimetszettük és az izomban futó artériát mikrosebészeti eszközökkel, apró vágásokkal izoláltuk a körülötte lévő izomtól, majd jégbe hűtött, oxigenált KREBS oldatban tartottuk. Ezt követően az izolált ér mintegy 2 mm hosszúságú, mellékágak nélküli szakaszát kimetszettünk. Ezt az érszakaszt üvegapillárisok segítségével, egy speciális szervkádban kanuláltuk KREBS oldatban. Az oldatot 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> tartalmú KREBS-re 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. Az erek átmérőjének változásait video mikroszkópia segítségével vizsgáltuk. Az adatokat Excel és Graph Pad szoftverek segítségével értékeltük.

#### **A TRPV1 receptor agonisták vizsgálata**

A TRPV1 agonisták hatására kialakuló érátmérő változásokat 0,1 nM-1 mM kapszaicin; 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; 1 nM-1 mM JYL-1511 jelenlétében vizsgáltuk. A kapszaicin által kiváltott válaszok specifikitásának vizsgálatára a TRPV1 antagonistá AMG9810-et használtuk. A gracilis arteriolákat vad típusú és

TRPV1 knockout egerekből is izoláltunk. A kapszaicin (0,1 nM-30 mM) dózis-hatás vizsgálatát mindkét egér típusnál elvégeztük.

### **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  $\mu$ M fura2-acetoximetil észter-t tartalmazó  $Ca^{2+}$ -os KREBS oldatban, mely inkubáció alatt a spontán miogén tónus is kialakult. Ezt követően a méréseket InCyt Im2 imaging rendszerrel végeztük. Az ereket váltakozva 340 és 380 nm-en világítottuk meg. Az 510 nm-nél nagyobb hullámhosszúságú emittált fényt mértük. A képeket 2-5 másodpercenként vettük fel, a kiértékelés pedig offline módban történt.

### **Simaizomsejtek izolálása és intracelluláris $Ca^{2+}$ -koncentráció változások mérése**

Intracelluláris  $Ca^{2+}$ -koncentráció méréseinkhez felnőtt beagle kutyából származó enzimatikusan izolált koronária simaizom sejteket használtunk. A sejteket 2 órára 1 mg/mL BSA-t és 5  $\mu$ M fura2-acetoximetil észtert 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  $\mu$ M kapszaicinnal és 100 mM KCl-dal kezeltük. Az adatokat InCyt 4.5 software-rel elemeztük és Excel, valamint GraphPad Prism 5.0 szoftverekkel dolgoztuk fel.

### **Eye-wiping teszt**

Az állat jobb, illetve bal konjunktívájára 10  $\mu$ l TRPV1 receptor agonistát (kapszaicin, 1  $\mu$ M; RTX, 10 nM; JYL-273, 1  $\mu$ M; MSK-195, 1  $\mu$ M; JYL-79, 1  $\mu$ M; JYL-1511, 1  $\mu$ M) 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.

## **Az anandamid érátmérőre gyakorolt hatásainak vizsgálata**

Izolált mikroér kísérleteinkhez az ereket az előzőekben leírt módon készítettük elő. Az erek miogén választ érátmérő meghatározással vizsgáltuk 20-120 Hgmm intraluminális nyomás alkalmazása mellett. Az ereket anandamiddal (0,1-30  $\mu\text{M}$ ), arachidonsavval (1  $\mu\text{M}$ ), kapszaicinnel (TRPV1 agonista, 1  $\mu\text{M}$ ), vagy WIN55-212-2-vel (CB1 és CB2 agonista, 1  $\mu\text{M}$ ) kezeltük. Ezen kezeléseket 40 perc regeneráció (alapos mosatás után) követte, és az érátmérőt a kísérlet végén is rögzítettük. Végül, a miogén választ újra megmértük  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében és annak hiányában is. Néhány esetben az arteriolákat előkezeltük baicaleinnel (lipoxigenáz inhibitor, 1  $\mu\text{M}$ ), indometacinnal (ciklooxygenáz inhibitor, 10  $\mu\text{M}$ ), PPOH-val (epoxigenáz inhibitor, 20  $\mu\text{M}$ ) és a FAAH inhibitor URB-597-tel (1  $\mu\text{M}$ ), és ezen előkezelések hatását is ellenőriztük mind az érátmérőre, mind az erek miogén válaszára, mely méréseket az anandamidnál már fentebb említett kezelés és mérési sor követte.

## **Immunhisztokémia**

A patkányból a fentieknek megfelelő módon kimetszett gracilis izom kis darabját Tissue-tek O.C.T. oldatba merítettük, majd folyékony nitrogénben fagyasztottuk. Ezt követően a blokkot kriosztátban metsztük (vastagság 10  $\mu\text{m}$ ), a metszeteket adherens tárgylemezre helyeztük és acetonnal fixáltunk. A fixált metszetet FAAH ellenes antitesttel 50 szerez hígításban végeztük. A FAAH-t expresszáló sejtek azonosítására simaizom aktint (hígítás: 1:100) alkalmaztunk.

## **Statisztika**

Statisztikai elemzéseinkhez Student féle t-próbát (a TRPV1 agonista kezelése 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

### A TRPV1 aktiváció által kiváltott vaszkuláris hatások

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

### A TRPV1 specifikus antagonistá AMG9810 hatásai

Az AMG9810 kompetitív módon gátolta a kapszaicin mediált válaszokat, amire a dózis-hatás görbe jobbra tolódásából következettünk. Az AMG9810 hatékonysága az általunk végzett kísérletekben (177 nM) összevethetőnek bizonyult az irodalomban található adatokkal (87,3 nM). A kapszaicin mediált kontraktilis válaszok TRPV1 specifitását TRPV1 knock out (TRPV1<sup>-/-</sup>) egereken is vizsgáltuk. A kapszaicin hatékonysága (EC<sub>50</sub>) ezekben a vizsgálatokban 137 nM-nak, a maximális hatás pedig vad típusú egyedekben 73%-nak bizonyult (éartméré csökkenés: 90 $\pm$ 8  $\mu$ m-ról 24 $\pm$ 3  $\mu$ m-re, n=6). A kapszaicin kezelés a TRPV1<sup>-/-</sup> egerek esetében nem vezetett vazokonstriktióhoz (n=5).

### A TRPV1 mediált konstriktió mechanizmusa

A kapszaicin mediált intracelluláris Ca<sup>2+</sup> változások vizsgálatára a Ca<sup>2+</sup>-imaging rendszert alkalmaztuk. Az intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-koncentráció és a patkány vázizom ereinek átméré-változásait (ebben az esetben a külső éartméré) párhuzamosan, ugyanazon az éren vizsgáltuk. A kapszaicin mediált vazokonstriktió együtt változott az intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-koncentrációval. Mind az éartméré, mind az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> változások dózis-függő jelleget mutattak (maximális hatás 1  $\mu$ M-os koncentrációnál). A TRPV1-et expresszáló sejttípus azonosítása érdekében arteriális simaizom sejteket izoláltunk kutyából származó koronária artériákból, majd az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> változásokat 1  $\mu$ M kapszaicin és 100 mM KCl jelenlétében vizsgáltuk. A kapszaicinre 10 sejt

esetében intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció növekedését tapasztaltuk. Ezen intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció emelkedés (340/380 arány növekedés:  $0,69 \pm 0,10$ -ról  $0,93 \pm 0,17$ -re,  $P < 0,05$ ) hasonló volt a KCl-dal kiváltott depolarizáció következtében kialakuló intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció növekedéshez (340/380 arány növekedés:  $1,04 \pm 0,20$ -re) ezekben a sejtekben.

## **A vaszkuláris TRPV1 farmakológiai tulajdonságainak vizsgálata**

A továbbiakban behatóan vizsgáltuk a vaszkuláris TRPV1 farmakológiai tulajdonságait. A kapszaicin hatékonysága ( $\text{EC}_{50}$ ) ebben az esetben 221 nM volt, 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  $\mu\text{M}$  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,  $n=9$ ), 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 (a válaszkészség csökkenése az agonista újraadását követően) jelenségét vizsgáltuk a 40 perces regenerációs fázis után kapszaicin (1  $\mu\text{M}$ ) adásával. Az érátmérő  $161 \pm 17 \mu\text{m}$ -ről  $109 \pm 18 \mu\text{m}$ -re csökkent ( $n=6$ ,  $P < 0,05$ ), ami részleges tachyphylaxisra utalt.

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

A JYL-273 egy újabb TRPV1 agonista, amelyet vizsgáltunk. Ez az anyag szintén nem volt képes vazokonstriktiót kiváltani az általunk vizsgált vázizomerekben (0,1 nM-0,1  $\mu\text{M}$ ,  $n=7$ ). A 20 perces kezelés alatt a JYL-273 esetében sem figyeltünk meg vazóaktív hatást ( $n=5$ ), míg ezen agonista a RTX-hoz hasonlóan, szintén a receptor teljes deszenzitizációját okozta ( $n=4$ ).

Kísérleteinkben az MSK-195 hatékonysága 120 nM-nak, míg maximális hatása  $71 \pm 11\%$ -nak ( $n=5$ ) bizonyult. A 20 perces kezelés alatt 1  $\mu\text{M}$  MSK-195 hatására tranziens konstriktió alakult ki (érátmérő csökkenés:  $255 \pm 19 \mu\text{m}$ -ről  $155 \pm 25 \mu\text{m}$ -re 90 másodperc alatt,  $n=6$ ). 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:  $193 \pm 25 \mu\text{m}$ ,  $P=0,03$  összevetve a kezelés előtti érátmérővel,  $n=6$ ). Az előzőekben leírt agonistákhoz hasonlóan az MSK-195 is képes volt a TRPV1 receptor teljes deszenzitizációját kiváltani.

A JYL-79-et találtuk a leghatásosabb vaszkuláris TRPV1 receptor agonistának ( $EC_{50}=3,6 \text{ nM}$ ,  $n=8$ ). A maximális hatása  $39 \pm 8\%$ -nak bizonyult ( $n=8$ ).  $1 \mu\text{M}$ -os koncentrációban (érátmérő csökkenés:  $228 \pm 13 \mu\text{m}$ -ről  $127 \pm 12 \mu\text{m}$ -re 100 másodperc alatt,  $n=5$ ) szintén tranziens vazokonstriktiót okozott. Az akut deszenzitizáció vizsgálata során az átmérő nem tért vissza a kezelés előtti értékre (érátmérő a 20 perces kezelés végén:  $204 \pm 12 \mu\text{m}$ ,  $p=0,046$  a kezelés előtti érátmérőhöz képest,  $n=5$ ). A 40 perces regenerációs fázist követően azonban az  $1 \mu\text{M}$  kapszaicin hatástalan volt ( $n=5$ ).

A TRPV1 stimulációs küszöbének megbecslése érdekében a parciális agonista JYL-1511-et is használtuk. A JYL-1511 dózis-hatás vizsgálata során a legmagasabb koncentrációban ( $1 \mu\text{M}$ ) az érátmérő a kezelés előtti  $239 \pm 17 \mu\text{M}$ -hez képest  $226 \pm 15 \mu\text{M}$ -re változott ( $P > 0,05$ ). A 20 perces kezelés ( $1 \mu\text{M}$ ) során nem tapasztaltunk érátmérő változást. A 40 perc regenerációt követően az  $1 \mu\text{M}$  kapszaicin az érátmérőt a JYL-1511 jelenlétében ( $1 \mu\text{M}$ )  $209 \pm 17 \mu\text{M}$ -re csökkentette. Ezen számszerű adatok alapján a JYL-1511 hatása ezen a receptoron a  $10 \pm 5\%$  agonizmus és  $70 \pm 11\%$  antagonizmus tartományba esik.

## **A vaszkuláris és szenzoros neuronális TRPV1 populációk közötti különbségek**

Tanulmányunk egyik fontos célja az volt, hogy összehasonlítsuk a szenzoros neuronokban expresszáldó 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 szemtörlések számában, míg a többi általunk használt TRPV1 receptor agonista növelte a szemtörlések számát.

## **Anandamid által kiváltott vazodilatáció**

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

## **Az anandamid hatásai az erek miogén tónusára**

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  $\text{Ca}^{2+}$  hiányában (passzív tónus). A 0,1  $\mu\text{M}$  koncentrációjú anandamid nem volt hatással a miogén tónusra. 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  $\mu\text{M}$ ) esetében. Ezek az eredmények egy anandamid szenzitív útvonalat sejtetnek, amely felelős lehet a dilatációt kiváltó ágensek szintéziséért és felszabadulásáért.

## **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 adásával. Az acetilkolin-mediált dilatatív válaszok károsodtak (endotélfosztás előtt az acetilkolin kiváltott érátmérő növekedés:  $180 \pm 8 \mu\text{m}$ -ről  $242 \pm 11 \mu\text{m}$ -re,  $P < 0,05$ , ami az endotél-fosztott erek esetében:  $173 \pm 14$ -ről  $188 \pm 10 \mu\text{m}$ -re,  $n=5$ ). Az acetilkolin csökkent dilatatív hatásaiért az endotél sejtek csökkent NO termelése

volt felelős, mert az NO donor nitroprusszid-nátrium (SNP) hatására maximális dilatáció alakult ki (n=5). Az endotélfosztás az erek miogén tónusát nem érintette (n=11). A sikeres endotélfosztást követően 30  $\mu$ M anandamid jelenlétében elvégeztük ugyanazokat a kísérleteket, mint ép endotéllel rendelkező ereink esetében. Az anandamid (30  $\mu$ M) által kiváltott bifázisos hatás dilatatív komponense megszűnt az endotél-fosztott erek vizsgálata során. A miogén tónusra gyakorolt hatás azonban hasonló volt az ép endotéllel rendelkező erek esetében kapott eredményeinkhez.

## **Az anandamid lebomlásának szerepe a dilatációban**

Az anandamid arachidonsavra való lebomlását a zsírsav-amid hidroláz (FAAH) gátlásával vizsgáltuk (1  $\mu$ M, URB-597, 5 percig inkubálva az anandamid hozzáadása előtt). A FAAH inhibitor jelenlétében az anandamid nem volt képes vasoaktív hatást kiváltani, viszont az inhibitor jelenléte az akut hatásokat nem befolyásolta. Az anandamid bomlástermék arachidonsav (1  $\mu$ M) anandamidhoz hasonló hatást váltott ki az ép endotéllel rendelkező ereknél, viszont endotélfosztás után nem volt hatással az erekre.

## **Funkcionális anandamid receptorok jelenlétének vizsgálata**

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

## **Az anandamid lebomlásából származó arachidonsav által kiváltott hatások vizsgálata**

Az anandamid útvonal további vizsgálatára a 30  $\mu$ M anandamid által kiváltott dilatációs mechanizmusokat vettük alapul (mivel ez a dózis jelentős dilatációt okozott a 20 perces kezelés alatt). Az anandamid metabolizmusának gátlása (1  $\mu$ M URB-597) teljes mértékben

megakadályozta az anandamid által kiváltott dilatációt. Az arachidonsav (1  $\mu\text{M}$ ) kezelés az anandamidhoz hasonló hatásokat váltott ki. A 40 perces regenerációs fázist követően is megvizsgáltuk ezen kezelések hatásait az érátmérőre. 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) gátolni volt képes. Az anandamid bomlásterméke, az arachidonsav hasonló hatásokat váltott ki ebben az esetben is. A miogén tónusra gyakorolt hatásokat is részletesen tanulmányoztuk. A TRPV1 receptor aktivációja kapszaicinnal (1  $\mu\text{M}$ ), illetve a kannabinoid receptorok aktivációja WIN55-212-2-vel (1  $\mu\text{M}$ ) nem volt hatással a miogén tónusra. Ezzel szemben a 30  $\mu\text{M}$  anandamid jelentősen csökkentette az erek miogén tónusát, amit az URB-597 (1  $\mu\text{M}$ ) előkezeléssel fel tudunk függeszteni. Az arachidonsav önmagában (1  $\mu\text{M}$ ) szintén miogén tónus csökkenést okozott.

Eredményeink alapján feltételeztük, hogy az anandamid által kiváltott vazodilatációban és miogén tónus csökkenésben az anandamid FAAH általi metabolizmusából származó arachidonsavnak van szerepe. Ennek vizsgálatára az 1  $\mu\text{M}$  koncentrációjú (legkisebb dózis, ami hatásos volt a miogén tónusra) anandamidot alkalmaztuk, és gátoltuk azon lehetséges útvonalakat, amelyek szerepet játszhatnak az arachidonsav különböző dilatatív ágensekké való továbbalakulásában. A lipoxigenáz (baicalein, 1  $\mu\text{M}$ ) és a citokróm P450 (PPOH, 20  $\mu\text{M}$ ) útvonalak gátlása során az 1  $\mu\text{M}$  anandamid tranzienst vazokonstriktiót okozott a 20 perces kezelés alatt. Ez a konstriktió a nagy koncentrációjú anandamid által okozott vazokonstriktió lefutásához volt hasonló (30  $\mu\text{M}$ ). Azonban az érátmérők a 20 perces kezelés végére szignifikánsan nem különböztek a kiindulási érátmérőktől. A 40 perces regenerációs fázis végére sem alakult ki semmilyen vaszkuláris hatás, kivéve a ciklooxygenáz indometacinnal történő gátlása során (10  $\mu\text{M}$ ). A miogén tónusra gyakorolt hatásokat vizsgálva, a baicalein nem volt képes gátolni az anandamid hatásait. Ezzel ellentétben a citokróm P450 gátlása PPOH-val (20  $\mu\text{M}$ ), illetve a ciklooxygenáz indometacinnal történő gátlása (10  $\mu\text{M}$ ) teljesen felfüggesztette az anandamid miogén tónusra gyakorolt hatásait.

## **FAAH expresszió a vázizomereken**

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

## 5. MEGBESZÉLÉS

### 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 vazokonstrikció alapján történt. Korábbi eredményeink alapján TRPV1 expressziót figyeltünk meg az általunk használt erek simaizom rétegében. Ezen eredményeket jelen tanulmányban kiegészítettük azzal, hogy az érátmérő csökkenésével párhuzamosan az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -koncentráció nő az erek falában; emellett ez az első alkalom, amikor bizonyítottuk a funkcionális TRPV1 jelenlétét izolált artéria simaizom sejtekben is. A TRPV1 stimulációjának következtében kialakuló vazokonstrikciót már korábban is írtak le, ezen hatást később meg is erősítették. Érdekes, hogy korábbi tanulmányokban leírtak a TRPV1 stimulációjával kapcsolatban egy koncentrációfüggő bifázisos hatást is; alacsony koncentrációjú kapszaicin dilatációt, míg a kapszaicin magasabb dózisa vazokonstrikciót okozott. Ez azt sugallja, hogy a dilatációért illetve konstrikcióért különböző farmakológiai tulajdonságú TRPV1 lehet felelős. A vazokonstrikció mechanizmusáról korábban azt feltételezték, hogy a TRPV1 által kiváltott konstrikcióban a szenzoros neuronokból felszabaduló endotelin-1-nek vagy a P-anyagnak lehet szerepe. Saját eredményeink arra utalnak, hogy a TRPV1 funkcionálisan expresszáldik a vázizomerek simaizom rétegében és aktivációja közvetlenül vezethet intracelluláris  $Ca^{2+}$ -koncentráció emelkedéshez és vazokonstrikcióhoz.

### A kapszaicin kiváltott konstrikció specificitása

A kapszaicin által kiváltott vazokonstrikció TRPV1 specificitását is vizsgáltuk. TRPV1 konckout egerekben a kapszaicin nem volt képes semmilyen vazoaktív hatást kifejteni. Az érfalban

a kapszaicin hatására az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció növekedését tapasztaltuk, mint ahogy az izolált simaizomsejtekben is. Megállapíthatjuk tehát, hogy vaszkuláris TRPV1 expresszálódik a simaizomsejtekben, és ezen receptorok aktivációja az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció növekedéséhez és így vazokonstrikcióhoz vezethet.

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), amely kompetitív módon gátolta a kapszaicin mediált konstrikciót. Ennek fontos következménye, hogy a fájdalomcsillapításra kifejlesztett antagonisták is befolyásolhatják a vázizom véreloszlását a vaszkuláris TRPV1 gátlásán keresztül.

Jelen tanulmány azt is célozta, hogy vizsgáljuk a vaszkulárisan expresszálódó TRPV1 farmakológiai tulajdonságait. A kapszaicin hatására jelentős vazokonstrikció volt megfigyelhető kanulált vázizom erek esetében. A kapszaicin mellett számos, a kereskedelmi forgalomban elérhető agonistát is teszteltünk. Jelentős különbségek vannak a maximális hatás, a hatékonyság és a deszenzitizációs képességben.

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. 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  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációt, ami viszont a vazokonstrikció kialakulásához elengedhetetlen. Egy másik hipotézis szerint a tachyphylaxis lehet a TRPV1 RTX által történő irreverzibilis aktiválásának is következménye, ami viszont tartós  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlással jár.

A kapszaicin adását követően tranziens lefutású konstrikciót kaptunk, majd az erek a kezelés végére teljesen deszenzitizált állapotba kerültek. A 40 perces regenerációs fázist követően a kapszaicin képes volt újra összehúzni az ereket, ami a receptorok reszenzitizációjára és részleges tachyphylaxisra utalt. Ezen eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a vaszkuláris simaizomokban expresszálódó TRPV1 és azon receptorok, amelyek a kapszaicin adását követően a szem

irritációjaért felelősek lehetnek *in vivo*, különböző ligand szelektivitással rendelkeznek, mint a CHO sejtekbe transzfektált receptrok.

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. Ami a vázizom erek TRPV1-függő vazokonstriktációját illeti, a receptor foszforiláció állhat a mechanizmus hátterében. Munkacsoportunk korábbi eredményei is erre utalnak, amennyiben az anandamid a RTX-hez, JYL-273-hoz hasonlóan a vaszkulárisan expresszáldó TRPV1 teljes deszenzitizációját okozta. Azt is kimutattuk, hogy az anandamid által kiváltott tachyphylaxis gátolható volt protein foszfatáz 2B (calcineurin) inhibitor jelenlétében.

## **Az anandamid vaszkuláris hatásai**

Behatóan vizsgáltuk az endogén TRPV1 agonistának vélt anandamid által kiváltott vaszkuláris hatásokat izolált vázizomereken. Az anandamid lebomlás *in vivo* jelentőségét mostanában kezdik felismerni, mely felismerés 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, azonban nincs nyilvánvaló hemodinamikai különbség a vad típusú egerekhez képest. Ezen megfigyelés összhangban van a FAAH gátlásával kapott eredményeinkkel. Az URB-597 (ugyanaz a FAAH inhibitor, melyet ebben a munkában használtunk) hatására csökkentek a gyulladáscsökkentő válaszok. 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 kannabinoid receptorok stimulációjának eredményei. Az anandamid általában vazodilatatív hatású, azonban ezen hatása nagyban függ a kísérletben használt

erektől. Az anandamid lebomlás vaszkuláris jelentőségére utaló első közlemény több mint egy évtizede jelent meg. Eszerint az anandamid a központi idegrendszerben arachidonsavvá, majd prosztaglandin E<sub>2</sub>-vé alakul át, és ezen molekulák indometacinnal gátolható (ciklooxygenáz mediált) dilatációt okoznak. További vizsgálatok is alátámasztották, hogy az anandamid lebomlása arachidonsavvá a vazodilatatív hatás egy fontos eleme lehet nagy átmérőjű erekben. Saját eredményeink ezt megerősítik kis átmérőjű rezisztencia erek esetében is.

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 zsírsav-amid 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 miogén autoreguláció károsodásához vezet.

Eredményeink arra utalnak, hogy az anandamid képes gátolni/csökkenteni a miogén válaszokat FAAH függő és endotél független útvonalakon keresztül. Ezen megállapításokat tovább vizsgáltuk a lehetséges mechanizmusok tekintetében. Az arachidonsav az anandamidhoz hasonló hatásokat váltott ki ép endotéllel rendelkező ereken. 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. Továbbá a jól ismert anandamid receptorok (TRPV1 és CB) stimulációja hatástalan volt a miogén tónusra.

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 epoxieicosatrién savak, mind a ciklooxygenáz által termelt prosztaciklinek szerepet játszanak a miogén tónus gyengítésében.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Tanulmányunkban kimutattuk, hogy a TRPV1 (nem specifikus  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna) aktivációja közvetlenül intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció emelkedéshez, és ezen keresztül vazokonstrikcióhoz vezet koronáriából izolált simaizom sejtekben illetve izolált vázizom erek 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. 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 a gyulladásához kapcsolódó lokális vazodilatációban is jelentős szereppel bírhat.

Iktatószám: DEENKÉTK/298/2012.

Tételszám:

Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Czikora Ágnes

Neptun kód: W82YSF

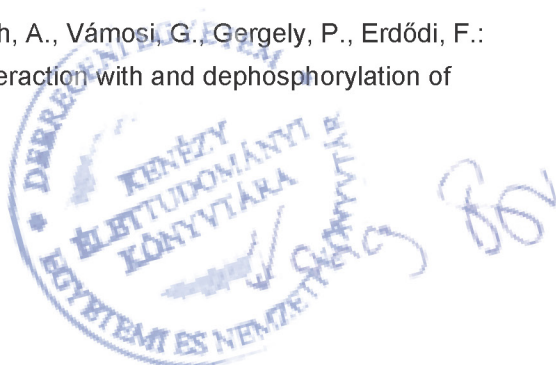
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Czikora, 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. **Czikora, 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., **Czikora, 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

