

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D) ÉRTEKEZÉS

**Az érátmérő szabályozása
a renin-angiotenzin rendszer és a vanilloid receptorok által**

Dr. Lizanecz Erzsébet

Témavezetők:

Dr. Mohácsi Attila

Dr. Tóth Attila



**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
KARDIOLÓGIAI INTÉZET, KLINIKAI FIZIOLÓGIAI TANSZÉK**

**Debrecen
2006**

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
BEVEZETÉS	5
<i>A renin-angiotenzin rendszer és az in-stent restenosis</i>	5
<i>Az AGT M235T polimorfizmusának meghatározása</i>	12
<i>A vanilloid receptor (TRPV1) és szerepe az arteriolák átmérőjének szabályozásában</i>	12
CÉLKITŰZÉSEK	17
MÓDSZEREK	18
<i>Az ISR vizsgálatában szereplő populáció</i>	18
<i>Genetikai analízis</i>	19
<i>Az ISR vizsgálat statisztikai analízise</i>	21
<i>A vázizom arteriolák izolálása és az érátmérő mérése</i>	22
<i>A TRPV1 kimutatása immunhisztokémiával és immunfluoreszcenciával</i>	23
<i>A TRPV1 expressziójának igazolása RT-PCR segítségével</i>	24
<i>A CHO-TRPV1 sejtek tenyésztése</i>	25
<i>⁴⁵Ca²⁺-uptake kísérletek</i>	25
<i>Intracelluláris Ca²⁺-koncentráció mérések</i>	26
EREDMÉNYEK	28
<i>Új PCR-RFLP módszer az AGT M235T polimorfizmusának meghatározásához</i>	28
<i>A renin-angiotenzin rendszer (RAS) polimorfizmusok és az in-stent restenosis (ISR) kapcsolata</i>	33
<i>Az anandamid és a kapszaicin vazóaktív hatása</i>	37
MEGBESZÉLÉS	50
<i>A RAS génpolimorfizmusai és az ISR kialakulása közötti összefüggések</i>	50
<i>Az új PCR-RFLP módszer jelentősége az M235T polimorfizmus meghatározásában</i>	53
<i>A TRPV1 funkció deszenzitizációja anandamiddal</i>	55
ÖSSZEFOGLALÁS	62
KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	63
IRODALOMJEGYZÉK	64
KÖZLEMÉNYEK	73

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACE	Angiotenzin konvertáz enzim
ACEI	Angiotenzin konvertáz enzim gátló
AGT	Angiotenzinogén
Ana	Anandamid
Ang	Angiotenzin
ARB	Angiotenzin receptor blokkoló
AT1R	Angiotenzin II 1. típusú receptor
AT2R	Angiotenzin II 2. típusú receptor
bp	bázispár
BSA	Szarvasmarha szérum albumin
CaMKII	Kalcium-calmodulin dependens kináz II
CB1	1. típusú kannabinoid receptor
cDNS	komplementer DNS
CGRP	Kalcitonin-gén rokon peptid
CHO	Kínai aranyhőrcsög ováriumából izolált stabil sejtvonal
CHO-TRPV1	TRPV1 expresszáló CHO sejtek
CI	Konfidencia intervallum
CX	Körbefutó koszorúsér
CY-A	Cyclosporin-A
DMSO	Dimetil-szulfoxid
DNS	Dezoxi-ribonukleinsav
dNTP	Dezoxi-nukleotid-trifoszfát
EF	Bal kamrai ejekciós frakció
FITC	Fluoreszcein-izotiocianát
FURA-2 AM	FURA-2 acetoximetilészter
GAPDH	Glicerol-aldehidfoszfát-dehidrogenáz
HEPES	4-(2-Hidroxietyl)piperazin-1-etánszulfonsav
HETE	Hidroxi-eikozatetraénsav
HPETE	Hidroperoxi-eikozatetraénsav
I/D	Inzerziós/Deléciós polimorfizmus
ISR	Hemodinamikailag szignifikáns in-stent restenosis
Kaps	Kapszaicin
K _d	Disszociációs állandó
LAD	Bal elülső leszálló koszorúsér
MI	Miokardiális infarktus
MS-PCR	Mutagenikusan szeparált PCR
mRNS	Messenger RNS
NADA	N-arachidonoyl-dopamin
NO	Nitrogén-oxid
OR	Valószínűségi arány (odds ratio)
PCI	Perkután koronária intervenció
PCR	Polimeráz láncreakció
PCR-ASO	PCR-allél specifikus oligonukleotid hibridizáció
PKA	Protein kináz A

PKC	Protein kináz C
PMA	4 α -forbol-mirisztát-acetát
PMSF	Fenil-metil-szulfonil-fluorid
PP2B	Protein phosphatase 2B, vagy calcineurin
PTCA	Perkután transluminális koronária angioplasztika
RAS	Renin-angiotenzin rendszer
RCA	Jobb koszorúsér
RFLP	Restrikciós fragmentum-hossz polimorfizmus
RNS	Ribonukleinsav
RT-PCR	Reverz-transzkripció PCR
SD	Standard deviáció
SDS	Nátrium-dodecil-szulfát
SNP	“Single-nucleotide” polimorfizmus
SSCP	Egyszálú DNS konformáció polimorfizmus
TRPV1	Vanilloid (kapszaicin) receptor
U	Enzimatis aktivitás egység (enzimtől függő egységben)

BEVEZETÉS

A renin-angiotenzin rendszer és az in-stent restenosis

A renin-angiotenzin rendszer (RAS) a vérkeringés és a testnedvek térfogatának egyik alapvető szabályozója, hatásai a rezisztenciaerek tónusára, a vérnyomásra, a folyadék felvételre, valamint az elektrolit forgalomra egyaránt kiterjednek (1). A RAS egyik fiziológiás funkciója a Na^+ konzerválás és így a fenyegető folyadékvesztés elleni védelem. A RAS működése során a plazma Na^+ -koncentrációjának csökkenése vagy a hipovolémia a vese juxtaglomeruláris sejtjeiből renint szabadít fel. Ez a proteáz a máj által termelt, keringő α_2 -globulinból, a mintegy 400 aminosavat tartalmazó angiotenzinogénből (AGT) egy decapeptidet, az angiotenzin I-et, (Ang I) hasít le. Az Ang I-nek elenyésző hatása van a vérnyomásra, az angiotenzin konvertáz enzim (ACE) azonban további két aminosav lehasításával angiotenzin II (Ang II) oktapeptiddé alakítja, ami a szervezet egyik leghatékonyabb vazokonstriktor hatású molekulája. Az Ang II G-fehérjékhez kapcsolt receptorokon fejti ki hatásait, melyek közül eddig legbehatóbban az 1-es és a 2-es típusú Ang II receptort (AT1R és AT2R) jellemezték. Az akut vazokonstriktió mellett az Ang II hosszú távon hatással van a sejtsztódást és növekedést irányító gének expressziójának szabályozására, ami a miokardium hipertrófiáját, illetve a rezisztenciaerek hipertrófiáját és hiperpláziáját eredményezheti. Az Ang II ezen, a kardiovaszkuláris betegségek pathomechanizmusában fontos hatásait elsősorban az AT1R receptorokon keresztül valósítja meg, míg az AT2R receptorok – legalábbis részben – ellentétes hatásokat, vazodilatációt, antiproliferatív és apoptotikus hatást közvetítenek (2). Klinikai szempontból fontos megjegyezni, hogy az Ang II szintézisében meghatározó szerepű ACE, az AngI mellett, a kallikrein hatására kininogénből

felszabaduló, vazodilatátor hatású bradykinint és kallidint is hasítja, s ezzel inaktiválja (3).

Az angiotenzin-konvertáz enzimet 1956-ban izolálták, és akkoriban „hypertensin converting enzyme” névvel illették (4). A humán ACE-nek két különböző formája ismert: a szomatikus forma, amely több szövettípus mellett, különösen nagy aktivitással található meg a tüdő endoteliális felszínén, valamint egy kisebb izoenzim, a germinális forma, mely kizárólag a herékben fordul elő, és fontos szerepet játszik a fertilitásban. Mindkét izoenzim egy C-terminus közeli transzmembrán régió keresztül, sejtmembránhoz kötött formában, a sejtek felszínén ektoenzimként expresszálódik, ahol keringő peptideket hasítanak. Létezik ugyanakkor egy a szérumban és más testfolyadékokban megtalálható szolubilis forma is, mely az ACE ektoenzim proteolízisének eredménye (5;6). Mind az Ang I, mind a bradykinin hidrolízise során az ACE karboxipeptidáz-dipeptidázként működik, azaz a szubsztrát C-terminálisáról egy dipeptidet hasít le. Néhány további molekula, például a substance P és a cholecystokinin esetében azonban endopeptidázként is képes működni (7;8).

Csaknem 50 évvel az ACE felfedezése után azonosították az enzim első humán homológját, az ACE2-t. Tekintettel arra, hogy az ACE2 cDNS-ét egy szívelégtelenségben szenvedő beteg kamrai szívmuszkulációjából izolálták, feltételezik, hogy szintén fontos szerepet játszhat bizonyos kardiovaszkuláris kórképekben. Az ACE2 is egy transzmembrán protein, ugyanakkor elsősorban hidrofób C-terminális aminosavak lehasítását katalizálja, karboxi-monopeptidázként (9;10).

A RAS szabályozásának modern megközelítése szerint a rendszerben több angiotenzin-eredetű peptid és egyéb mediátor is részt vesz. Néhány szövettípusban az

Ang II-t nemcsak az ACE, hanem más enzimek is szintetizálják, például a szívben expresszáldó kimáz (11). Az Ang II-n kívül, a molekula N-terminálisának aminopeptidáz-A általi hasításával keletkező Ang III is képes az AT1R és AT2R receptorokon a jelátvitelre, az Ang II-höz hasonló affinitással. Jelenleg úgy tűnik, az Ang III-nak kulcsszerepe van a központi idegrendszerben, részt vesz a vérnyomás központi szabályozásában és a vazopresszin felszabadításában (12;13). Az Ang III aminopeptidáz-N általi további hasításának eredménye az Ang IV, melynek perifériás és centrális hatásait is feltételezik. A periférián az Ang IV fokozza a vese vérátáramlását, natriuretikus és vazoaktív tulajdonságokkal bír, míg a központi idegrendszerben a tanulási és memóriefunkciókban vesz részt (13;14). A RAS működésének megismerését tovább segítette az Ang₁₋₇ molekula jellemzése, mely az eddig megismert Ang-származékokkal alapvetően ellentétes hatásokat közvetít, elősegíti a vazodilatációt, antiproliferatív és apoptotikus tulajdonságú (15-17). Az Ang₁₋₇ keletkezésében valószínűleg az ACE2 és más karboxipeptidázok vesznek részt (18).

A RAS-ban különböző negatív visszacsatolási útvonalak játszhatnak szerepet az egyes peptidek keletkezési és lebomlási sebességének szabályozásában (19). A szabályozás felborulásakor a rendszer számos eleme közül a legkártékonyabb eredménnyel az Ang II felszaporodása jár, hiszen az általa kiváltott vazokonstrikció, sejt-hipertrófia és hiperplázia olyan betegségek kialakulásának kezdeti lépéseit jelentik, mint a hipertónia, az atherosclerosis, következményes koszorúsérbetegséggel, szívinfarktussal, szívelégtelenséggel (20). Így a RAS komponensei közül az Ang II keletkezésében kulcsszerepet játszó, illetve hatását közvetítő AGT, ACE és az AT1R számítanak a mai napig a legfontosabb, mindenesetre a legtöbbet vizsgált molekuláknak.

Az 1990-es évek elejétől a RAS működését molekuláris biológiai eszközökkel is vizsgálják. Az AGT, az ACE illetve az AT1R humán génjeinek klónozása számos genetikai polimorfizmus felfedezéséhez vezetett, melyek közül több is gyanúba keveredett, mint a fenti kórképek esetleges rizikófaktora (21-24).

A génpolimorfizmus a gént meghatározó DNS-szakasznak olyan változata, mely az adott populációban 1%-os vagy annál nagyobb gyakorisággal fordul elő. Ezek a módosulatok jelenthetnek a DNS molekulán belül hosszabb-rövidebb nukleotid-szekvencia beékelődését vagy kiesését („insertion/deletion”), egyetlen nukleotid kicserélődését („single nucleotide polymorphism”, SNP) vagy egy nukleotid-szekvencia különböző számú, egymás utáni ismétlődését (angol kifejezéssel variable number tandem repeats). Ezek a változások a DNS molekulában megváltoztathatják a génről átíródó fehérje mennyiségét, aktivitását, megváltoztathatják a fehérje szintézisének idejét, időtartamát, helyét. Mindezek által egyes génpolimorfizmusok szerepet játszhatnak a gén által kódolt protein expressziójának fiziológias változásaiban, valamint patológias folyamatok iniciálásban és progressziójában. Annak ellenére, hogy a DNS-szekvencia változásoknak csupán töredéke jár funkcionális következményekkel (legalábbis egyelőre ennyit tudunk kimutatni), figyelmen kívül sem hagyhatjuk létezésüket, hiszen számos polimorfizmus akár a populáció felét érintő gyakorisággal is előfordulhat. Ráadásul amennyiben sikerül jelentőségüket tisztázni, az hozzájárulhat az érintett biokémiai szisztéma megváltozott működésével összefüggő betegségek mechanizmusának megértéséhez, segíthet a betegség rizikójának felmérésében, utat mutathat a terápia megválasztásában és vezetésében, végső soron lehetőséget teremthet a génterápiára is.

Az AGT egy 55-65 kD molekulásúlyú globuláris glikoprotein, génje az 1. kromoszóma 1q42-43 régiójában található, 5 exont és 4 intront tartalmaz. Közel 20 molekuláris variánsa ismert. Ezek közül az M235T polimorfizmus a 2. exonban található, ahol a 704. nukleotid pozícióban a timin citozinra cserélődik. A mutáció eredménye a 235. aminosav pozícióban egy treonin megjelenése, a vad típusban található metionin helyett. A T235 allélt hordozó egyénekben korábbi vizsgálatok emelkedett plazma AGT koncentrációt találtak (22;25).

Az ACE molekulásúlya 90-160 kD közötti tartományban változik. Génje a 17. kromoszóma hosszú karján helyezkedik el, 26 exonból és 25 intronból áll. Annak alapján, hogy a 16. intronban található-e egy 287 bp-nyi repetitív, ún. *alu*-szekvencia, az ACE-gént egy Inzerció/Deléción (I/D) polimorfizmussal szokták jellemezni. II-homozigótákkal összehasonlítva, az ACE szérumszintje DD-homozigótákban magasabb, míg ID-heterozigótákban az II és DD genotípusok közötti értéken helyezkedik el (23). Az irodalomban vannak arra utaló adatok, hogy az I/D polimorfizmus bizonyos szövethéleségeken befolyásolja az ACE aktivitást (23;26;27).

A 41 kD molekulásúlyú AT1R génje a 3. kromoszóma 3q21-q25 régiójában található. Az A1166C polimorfizmus a 3' vég át nem íródó régióban az 1166. nukleotid pozícióban egy adenin citozinra cserélődését jelenti. Vizsgálatok szerint a C allél emelkedett kardiovaszkuláris kockázattal járhat (21). A polimorfizmus teljes funkcionális jelentőségének feltárása azonban még várat magára, nem sikerült ugyanis kimutatni a C-alléllal kapcsolatos változásokat sem az AT1 receptor denzitásában, sem az affinitásában (28;29).

Magyarországon a koszorúsérbetegség és az iszkémiás szívbetegség vezető halálóki tényezők, és ebben a tekintetben Magyarország vezető pozíciót foglal el az egész Európai Unióban, beleértve az újonnan csatlakozott államokat is. A helyzet javítása érdekében fontos azon egyének mihamarabbi azonosítása, akik a kardiovaszkuláris morbiditás és mortalitás fokozott rizikóját hordozzák. A koszorúsér-szűkület kezelésének legelfogadottabb módszerévé napjainkra a perkután behatolásból elvégzett ballon-tágítás, és egy fémháló, az úgynevezett stent beültetése vált (percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA). A csupán ballonnal végzett tágítás legnagyobb hátránya az ily módon kezelt erek újbóli beszűkülése, a restenosis és a rekurrens restenosis, ami az első valamint az ismételt PTCA-t követően hozzávetőlegesen a betegek 30%-ában jelenik meg (30). A koronária stentek elterjedése, és az újabban alkalmazott gyógyszerrel bevont – drug-eluted – stentek alkalmazása hatékonyan csökkentette a restenosis előfordulásának gyakoriságát, ám az egyre növekvő tapasztalat és a legmodernebb technika alkalmazása ellenére sem sikerül teljesen kiküszöbölni a lumen újbóli beszűkülését.

Angiológiai nomenklátúra alapján in-stent restenosisról akkor beszélünk, ha a sikeres PTCA-t követően a kontroll angiográfián 50%-osnál nagyobb luminális szűkületet látunk a stent területén belül (30). A folyamat rendszerint a beavatkozást követő 1. és 6. hónap között megy végbe. Kialakulásában szerepet játszanak (i) klinikai tényezők, állapotok, melyek már az alapbetegség kialakulását is elősegítették (hipertónia, diabetes mellitus, korábbi miokardiális infarktus, stb), (ii) angiográfiai tényezők (a bal elülső leszálló artéria szűkülete, kis érátmérő, teljes elzáródás, hosszú szűkület, graft), (iii) a procedúrával kapcsolatos tényezők (kisebb „acute gain”, az érfal sérülése), (iv) a stenttel kapcsolatos tényezők.

Mint ahogyan maga a koronária-betegség, a restenosis is egy multifaktoriális betegség, melynek folyamata még napjainkban sem ismert tökéletesen. A stimulus, amely elindítja a restenosis kialakulásához vezető események láncolatát, a ballon-tágítás és a stent-behelyezés által okozott érfalsérülés. Mivel a stentelés kiküszöböli az érfal visszarugódását a ballon-tágítást követően, az in-stent restenosis nagyrészt neointima-proliferációnak köszönhető (31;31;32). Az artéria falának sérülése helyén az aktiválódó trombociták növekedési faktorokat szabadítanak fel, melyek leukocita-infiltrációt, a simaizomsejtek expanszióját, extracelluláris mátrix lerakódást indítanak el, és re-endothelializáció jelenik meg. Mindezek alapján azok a rendszerek, melyek bizonyos polimorfizmusait az in-stent restenosis kialakulásával összefüggésbe hozták, a következők: a trombocita aggregáció rendszere, a gyulladásos válaszreakció, a mátrix metalloproteinázok, a simaizom proliferáció növekedési faktorai, különböző (apo)lipoproteinek, az oxidatív stressz reakció és NO-metabolizmus, valamint a renin-angiotenzin rendszer, melynek kulcsmolekulája, az Ang II, az egyik legfontosabb regulatórikus növekedési faktor a neointima proliferáció kialakulásában (33). Mind az ACE, mind az Ang II jelenlétét kimutatták az érszövetben, és azt is igazolták, hogy ezek az anyagok részt vesznek bizonyos vaszkuláris léziók kialakulásában (20).

Többen feltételezték, hogy a RAS génjeinek polimorfizmusai befolyásolhatják a restenosis megjelenését koszorúsér-stentelést követően. Ennek megfelelően az elmúlt másfél évtizedben számos vizsgálat született az ISR kialakulása és a RAS genetikai polimorfizmusai közötti kapcsolat felderítésére (34-49). A genetikai epidemiológiai tanulmányok értékelésekor azonban nem szabad figyelmen kívül hagynunk, hogy a genetikai háttér egyes etnikai csoportok között különböző lehet. Így például egy

génmutáció vagy polimorfizmus prevalenciáját a japán lakosság körében nem extrapolálhatjuk a kaukázusi páciensekre, hasonlóképpen a különböző populációk esetében leírt asszociációkat a magyar lakosság körében is ellenőrizni kell.

Az AGT M235T polimorfizmusának meghatározása

Az AGT gén M235T polimorfizmusának kardiológiai betegségekkel történő asszociációjának meghatározása során, a különböző vizsgált populációkban meglehetősen ellentmondásos eredmények születtek (50-52). A bizonytalanságot tovább növelheti, hogy az egyes tanulmányok során eltérő laboratóriumi módszereket alkalmaztak. Az AGT M235T genotípusok meghatározására legalább négy különböző módszert használtak eddig, úgymint (i) polimeráz láncreakciót (PCR) követő allél-specifikus oligonukleotid hibridizációt (PCR-ASO) (53), (ii) olyan PCR reakciót (MS-PCR), amelyben három primer felhasználásával az összes lehetséges allélt felszaporították (54), (iii) egyszálú DNS konformáció polimorfizmus (SSCP) analízist (55) és (iv) PCR-restríciós fragment méret polimorfizmust (PCR-RFLP) (56). Laboratóriumunkban ez utóbbi, PCR-RFLP módszer beállítása során számos technikai nehézségbe ütköztünk. Célunk volt tehát a megbízhatóbb genotíplás elérése érdekében a PCR-RFLP módszer továbbfejlesztése.

A vanilloid receptor (TRPV1) és szerepe az arteriolák átmérőjének szabályozásában

Az emlős transziens receptor potenciál (TRP) csatornák családjának vanilloid (TRPV) alcsaládjába jelenlegi ismereteink szerint 6 ioncsatorna tartozik (TRPV1-6). Ezeket a receptorokat olyan fájdalmat okozó fizikai és kémiai hatások aktiválják, mint a magas hő, az alacsony pH, extracelluláris ozmolaritás és nyomásváltozások, vagy az

intracelluláris Ca^{2+} raktárak kiürülése. Ugyanakkor a TRPV1 közülük az egyetlen, melyet a paprika csípősségéért felelős kapszaicin és tágabb értelemben az úgynevezett vanilloidok is képesek aktiválni. Így a TRPV1 a hétköznapi szóhasználatban kiérdemelte a vanilloid receptor elnevezést (57).

Mivel a TRPV1 különböző fájdalmas stimulusok molekuláris integrátora, szöveti megoszlásáról korábban azt feltételezték, hogy mindenekelőtt a fájdalmat közvetítő nociceptorok, a primer szenzoros neuronok, az A δ és C típusú vékony filamentumok expresszálják (58). Később azonban különböző központi idegrendszeri régiókban, a cortexben, a hippocampusban, a corpus callosumban, sőt astrocytákban és pericytákban is sikerült igazolni jelenlétét (59;60). Ráadásul a TRPV1 expressziója a periférián sem csak a neuronális szövetekre korlátozódik; megtalálható az epidermis keratinocytáiban, a húgyhólyag urotéliumában és simaizomzatában, a májban és makrofágokban is (61-63).

A TRPV1 molekulatömege 95 kD körüli, 4 fehérjealegységből álló homomer vagy heteromer formában képez csatornát (64). Minden alegység 6 transzmembrán doménből áll, amelyekben az 5. és 6. domén között egy hidrofób P-hurok található. Intracelluláris N-terminálisa egy prolin-gazdag régiót, valamint 3 ankyrin-domént tartalmaz. C-terminálisa szintén intracellulárisan helyezkedik el. (58).

A TRPV1 funkcióját tekintve egy nem-specifikus kation csatorna, viszonylag nagy szelektivitással a kalciumra, így aktiválódása az érintett sejt intracelluláris kalcium-koncentrációjának emelkedéséhez vezet. Amellett, hogy a nociceptorok axonterminálisainak ingerlése központi idegrendszeri stimulációhoz, végeredményben fájdalomérzet kialakulásához vezet, az intracelluláris kalcium-koncentráció emelkedése különböző neurotranszmitterek, például CGRP és a substance P lokális felszabadulását is

eredményezi (65;66). A továbbiakban a felszabadult neurotranszmitterek újabb mediátorokat szabadítanak fel, így a szenzoros funkció mellett a vanilloid receptorok egy effektor mechanizmusnak is résztvevői (67).

Viszonylag keveset tudunk a vanilloid receptor endogén ligandjairól. Eddig 3 lipid típusú molekulacsoportot azonosítottak, melyek mindegyike az arachidonsav-metabolizmus során keletkezik: az arachidonsav bizonyos lipoxigenáz-produktumai (12-HPETE, 15-HPETE, 20-HETE) (68;69), az *N*-arachidonoyl-dopamin (NADA) (70) és az *N*-arachidonoyl-ethanolamid, másnéven anandamid (66). Ez utóbbit eredetileg a G-protein kapcsolt, metabotrop típusú kannabinoid receptor-1 (CB1) aktivátoraként ismerték meg (71). Míg a különböző kísérleti rendszerekben az anandamid hasonló affinitással aktiválta a CB1 és a TRPV1 receptorokat (72;73), hatékonyságát tekintve jelentős különbségeket találtak: egyes kísérleti rendszerekben teljes (66;74;75), másokban parciális agonistának bizonyult (68;70;76). Összességében megállapítható, hogy a molekula hatékonysága a TRPV1 receptorokon alacsonyabb, mint a CB1 receptorokon, továbbá, hogy azokban a szövetfélésekben és sejtvonalakban, melyekben alacsony a TRPV1 receptor expresszió, az anandamid parciális TRPV1 agonistaként viselkedik. Hatékonyságát több tényező is befolyásolhatja. Egyrészt feltételezik egy olyan membrán-transzporter létezését, mely az anandamid sejtbe való bejutásáért felelős, s ezen transzporter szerepét fontos megvilágításba helyezi az a tény, hogy a TRPV1 vanilloid – anandamid – kötőhelye intracellulárisan helyezkedik el (77;78). Másrészt a sejtbe bejutott anandamidot zsírsavamid-hidrolázok, valamint különböző oxigenázok bontják el (79;80). Érdekes, hogy az anandamid hozzáférhetőségét növelni képes egy

másik acyl-ethanolamid, a palmitoyl-ethanolamid, feltehetőleg az anandamid lebontás sebességének csökkentése révén (77).

Korábban kimutatták, hogy a TRPV1 parciális aktivációja más endogén ligandok számára részleges gátló hatást idézhet elő (73). Ilyen ligand lehet a NADA (70;81) vagy más, még nem azonosított endogén ethanolamidok (65;70). Azt is feltételezik, hogy a TRPV1 anandamiddal való aktiválása a receptor deszenzitizációját okozza az újbóli agonista stimulációra (tachyfilaxis) (76;82).

Az egyik legfontosabb szabályozó tényező azonban a molekula hatékonysága szempontjából a receptor foszforilációs állapota. A TRPV1-et a protein kináz A (PKA) (83), a protein kináz C (PKC) (84) és a Ca^{2+} /calmodulin dependens kináz II (CaMKII) (85) is képes foszforilálni, számos foszforilációs helyen. A TRPV1 PKA és PKC általi foszforilációja érzékenyíti a receptort a különböző vanilloidokra, az anandamidra, a hő és protonok általi stimulációra (78). Ráadásul ebben a folyamatban egy olyan erősítést is feltételeznek, amelyben az anandamid stimulálja a PKC-t, ami az agonista által kiváltott válasz növekedéséhez vezet (86). A TRPV1 szenzitizációt közvetítő PKC izoenzim vonatkozásában azonban egyelőre csupán ellentmondásos adataink vannak (87-89).

A vanilloid receptor szerepét számos szerv fiziológias működésében vizsgálták, és nagyon sokféle betegség kialakulásával, patofiziológiájával összefüggésbe hozták (90). Ami érdeklődésünk a receptornak és ligandjainak a mikroarteriolák átmérőjére gyakorolt hatása felé irányult.

Ezek az 500 μm -nél kisebb átmérőjű arteriolák határozzák meg az egyes keringési területek, szövetek aktuális, lokális vérellátását. Korábban leírták, hogy a kannabinoid és a vanilloid receptorok stimulálásán keresztül mind az anandamid, mind a kapszaicin

vazodilatációt okoz mezenteriális, hepaticus, baziláris és meningeális erekben (66;75;91-93). Ezekben az arteriolákban az anandamid-mediált vazorelaxációt főleg (66;75;91;92), vagy részben (93) a TRPV1 stimulációnak tulajdonították. A TRPV1 aktiválása a mezenteriális erekben, az ereket innerváló szenzoros idegvégződésekből felszabaduló CGRP hatására hozta létre a vazodilatációt (66). Mindezek mellett azt is leírták, hogy a TRPV1 stimulálása patkány és kutya mezenteriális (69;94) illetve koszorúerekben (95) vazokonstriktiót képes okozni. Az utóbbi esetben a TRPV1-mediált substance P (69) vagy endotelin (95) felszabadulását hozták szóba lehetséges mechanizmusként. Sőt, arra is vannak adatok, hogy az *in vivo* anandamid kezelés átmeneti vazokonstriktiót okozott éber patkányokban vese, mezenteriális és végtagi ereken (96).

Keveset tudunk ugyanakkor a vanilloid receptorok funkcionális szerepéről a vázizom arteriolákban, melyek lényeges szerepet töltenek be a keringés szabályozásában, a véreloszlás meghatározásában. Vizsgálataink célja a funkcionális vanilloid receptorok kimutatása vázizom-arteriolákban, és a receptor anandamiddal történő stimulációjának tanulmányozása volt. A receptor-mediált celluláris hatások specifikus értékelése érdekében egy TRPV1 overexpresszáló sejtvonalat (CHO-TRPV1) használtunk. Végül, jellemeztük a receptor foszforiláltsági állapotának szerepét is.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során az alábbi célkitűzések kísérletes megvalósítását hajtottuk végre:

- Az ACE I/D, AT1R A1166C és az AGT M235T polimorfizmusok meghatározása
- Az ACE I/D, az AGT M235T és az AT1R A1166C polimorfizmusa és az in-stent restenosis megjelenése közötti összefüggések vizsgálata perkután koronária intervención átesett betegek körében
- Funkcionális vanilloid receptorok kimutatása vázizom arteriolákban
- A TRPV1-et expresszáló sejtípusok azonosítása
- A receptor anandamiddal történő stimulációjának tanulmányozása
- A receptorműködés celluláris hatásainak specifikus vizsgálata TRPV1 overexpresszáló sejtvonal segítségével
- A foszforiláció szerepének vizsgálata a receptor anandamid válaszkészségének szabályozásában

MÓDSZEREK

Az ISR vizsgálatában szereplő populáció

A vizsgálatban 239 beteg vett részt (valamennyien kaukázusiak, észak-kelet magyarországi lakosok), akiknél a stent-implantációt követően visszatérő panaszok és/vagy pozitív terheléses vizsgálatok miatt kontroll-angiográfia történt. Az angiográfiák az intézeti irányelveknek megfelelően készültek. A felvételeket két tapasztalt, független kardiológus értékelt. A koszorúsér-léziók ábrázolása legalább két ortogonális projekcióban történt, 0.5 mg nitroglycerin intrakoronáriás adását követően. A későbbi angiográfiáknál az első beavatkozásnál alkalmazott projekciókat használták. A kardiológusok közötti véleménykülönbség esetén egy további közös elemzés következett. Az in-stent restenosis, a közvetlenül az intervenciót követően készült felvételhez viszonyítva, 50 %-nál nagyobb, hemodinamikailag szignifikáns lumenszűkületként definiáltuk. A hagyományos kardiovaszkuláris rizikófaktorokra vonatkozó klinikai adatokat a kórlapokból gyűjtöttük ki. A genetikai vizsgálatokat a kontroll-angiográfia előtt végeztük el.

A betegek (n=239) átlagéletkora 58.9 ± 9.4 év volt; 155 volt közülük férfi. 224-nek (93.7%) stabil anginája volt, 15-nek (6.3%) instabil anginája. 60 (25.1%) volt diabetéses, 148 (61.9%) szenvedett hypertóniában és 147 (61.5%) páciens esett át korábban miokardiális infarktuson. A stentelést követő gyógyszeres terápia minden beteg esetében tartalmazott aspirint (100 mg naponta) és clopidogrelt (75 mg naponta). ACE-gátló beépítése a terápiaiba a kezelőorvos döntésén alapult. A felírt ACE-gátlók között elsősorban enalapril (33.1%) és ramipril (26.4%) szerepelt, más hatóanyagok kisebb százalékban fordultak elő (perindopril: 14,2%, monopril: 3,8%, quinapril: 2,9%,

lisinopril: 1,3%, fosinopril: 0,4%). Az előírt adagokat a vérnyomással és a funkcionális stádiummal kapcsolatban észlelt klinikai hatásokhoz igazították.

A vizsgálatot a „World Medical Association” Helsinki Deklarációjával (2000) összhangban végeztük. Valamennyi beteg tájékozott beleegyezését adta a diagnosztikus és terápiás eljárásokhoz.

Genetikai analízis

A genomi DNS-t perifériás vér fehérvérsejtjeiből izoláltuk, FlexiGene DNA Kit segítségével (Qiagen, Hilden, Germany). Az ACE-gén I/D polimorfizmusát a Rigat és munkatársai által leírt PCR-módszer módosításával határoztuk meg (24). A “downstream” primer szekvenciája 5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3', az “upstream” primer szekvenciája 5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T-3' volt (Sigma, Steinheim, Germany). A PCR-t 25 µl végtérfogatban végeztük, melynek összetétele: 50 ng genomi DNS, 1 µM mindkét primerből, 200 µM dNTP, 3 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3) és 1 U Taq DNS polimeráz (Sigma, Schnellendorf, Germany). 5% DMSO-t használtunk, hogy elkerüljük a heterozigóta genotípus gyakoriságának alulbecslését és a DD genotípus gyakoriságának túlbecslését (97). Az alkalmazott PCR protokoll: 94 °C-os 5 percig tartó kezdő denaturáció után 30 ciklus következett, mely az alábbi lépésekből állt: 20 s 94 °C-on, 20 s 55 °C-on és 60 s 72 °C-on. A reakciót egy 72 °C-os 5 perces elongáció zárta. A PCR-termékeket (490 bp az inzerció, illetve 190 bp a deléciónál) 5%-os poliakrilamid gélen futtattuk meg és etidium-bromid festéssel tettük láthatóvá.

Az AGT-gén M235T polimorfizmusának meghatározásához először a Russ és munkatársai által leírt PCR-RFLP-n alapuló eljárást (56) használtuk. A sense primer

szekvenciája 5'- CCG TTT GTG CAG GGC CTG GCT CTC T -3', az antisense primer szekvenciája 5'- CAG GGT GCT GTC CAC ACT GGA CCC C - 3' (Sigma, Steinheim, Germany) volt. A PCR elegy (25 µl) összetétele: 50 ng templát DNS, 1µM mindkét primerből, 200 µM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3) és 1 U Taq DNS polimeráz (Sigma, Schnelldorf, Germany). A 94°C-on 5 percig tartó kezdő denaturáció után 30 ciklus következett, melyek az alábbi lépésekből álltak: 94°C 20 s, 59°C 20 s és 72°C 40 s. A reakciót 5 perces, 72°C-on történő inkubáció zárta. A PCR reakció specifitásának növelése érdekében az 59°C-os annealing hőmérsékletet néhány kísérletben 68°C-ra emeltük. A PCR-termékeket az ugyanarra a restrikciós szekvenciára specifikus (G-A-C-N-N-N-G-T-C) Tth 111 I (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) vagy Psy I (Fermentas, Vilnius, Lithuania) enzimekkel hasítottuk 37°C-on 2 órán át.

Későbbi kísérleteinkben a fenti protokollt továbbfejlesztettük. Ennek során a reakcióelegyhez 10% DMSO-t adtunk, az antisense primert módosítottuk: 5'- GCC AGG GTG CTG TCC ACA CTG ACT CCC - 3' (Sigma, Steinheim Germany), továbbá 64°C-os annealing hőmérsékletet alkalmaztunk. Az ezen módszerrel kapott PCR-termékeket Box I (Fermentas, Vilnius, Lithuania) enzimmel emésztettük 37°C-on 2 órán át.

Mindkét fentebb leírt módszer esetében a keletkezett DNS-fragmentumokat 10%-os poliakrilamid gélen választottuk el és etidium-bromid festéssel tettük láthatóvá. Az emésztetlen 165 bp-nyi DNS termék az M allélra, míg a hasított DNS (141 és 24 bp-os fragmentumok) a T allélra jellemző.

Az AT1R-gén A1166C polimorfizmusát szintén PCR-RFLP technikával határoztuk meg Steeds és mtsai nyomán, kisebb módosításokkal (98). A sense primer szekvenciája 5'-GCT TTG TCT TGT TGC AAA AGG-3', az antisense primer szekvenciája 5'-CCC ACT CAA ACC TTT CAA CA-3' volt (Sigma, Steinheim, Germany). A PCR-reakcióelegy (25 µl) összetétele: primer 2 µM (mindkét primerből), 200 µM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3) és 1 U Taq DNS polimeráz (Sigma, Schnellendorf, Germany). A 95 °C-os, 7 percig tartó kezdő denaturáció után 35 amplifikációs ciklus következett: 95 °C-on 20 s, 45 °C 20 s és 72 °C 40 s. Végül egy 72 °C-os 5 percig tartó inkubációval zártuk a reakciót. A PCR-termékeket 1 U *Dde I* enzimmel emésztettük (Promega, Madison, USA) 37 °C-on 2 órán át. Az emésztett PCR termékeket 10%-os poliakrilamid gélen választottuk el és etidium-bromiddal tettük láthatóvá. Az A allél esetében az emésztés két DNS fragmentumot eredményezett, egy 249 és egy 47 bp-osat, míg a C allél három sáv formájában jelent meg, 143, 106 és 47 bp-nál.

Az ISR vizsgálat statisztikai analízise

Az allélfrekvenciák számítását, valamint a Hardy-Weinberg szabállyal való összevetését a χ^2 analízissel végeztük. A kvantitatív klinikai paraméterekre vonatkozó adatokat átlag \pm standard szórás (SD) formában fejeztük ki, míg a további jellemzők százalékos gyakoriságban vagy abszolút számokban vannak jelölve. Az egyes csoportok között χ^2 teszttel (nominális adatok) vagy Student's *t*-teszttel (folyamatos változók) végeztünk összehasonlításokat. A $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Egy logisztikus többváltozós modellt is alkalmaztunk, hogy az egyes rizikófaktorok ISR-ra vonatkozó prediktív értékét felmérjük. A statisztikai elemzéseket

az „Analyse-it for Microsoft Excel” (Analyse-it Software, Leeds, UK) program segítségével végeztük.

A vázizom arteriolák izolálása és az érátmérő mérése

Altatott (intraperitoneális pentobarbitál, 50 mg/kg) Wistar patkányokból a m. gracilisban intramusculárisan futó arteriolát izoláltuk, operáló mikroszkóp alatt, mikrosebészeti eszközökkel. Az izolált arteriolát fiziológias sóoldatot (Krebs) tartalmazó szervfürdőbe tettük. Az oldat összetétele a következő volt: 110 mM NaCl, 5 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1mM MgSO₄, 1 mM KH₂PO₄, 5 mM glükóz, 24 mM NaHCO₃, 10% O₂-t és 5% CO₂-t nitrogén-gázeleggyel egyensúlyban tartva (pH 7,4). A szervfürdőben az artéria mindkét végét üveg kapillárisok segítségével kanuláltuk. Az intraluminális nyomást 80 Hgmm-re állítottuk, míg a hőmérsékletet termosztát segítségével 37°C-on tartottuk. A belső érátmérőt az arteriola-szegmens közepén folyamatosan mértük (99). Az erek szervfürdőben történő kanulálását követően 60-120 perc regenerációs periódus következett, amely során az erek spontán miogén tónusa kifejlődött. Az endotélium épségét valamennyi kísérlet előtt acetilkolinnal (100 nM, 30 s) ellenőriztük. A simaizom-funkciót norepinefrin (100 nM, 30 s) alkalmazásával vizsgáltuk, szintén minden kísérlet előtt. A kapszaicin és anandamid válaszkészség meghatározásakor kumulatív dózis-hatás vizsgálatokat alkalmaztunk. Az ereket TRPV1 ligandok mellett a protein foszfatáz-2B (calcineurin) gátlószer cyclosporin-A-val (CY-A) is kezeltük az ábrákon jelzett módon (9., 10. ábra). Az állatkísérleteket a National Institute of Health szabályzatának megfelelően végeztük.

A TRPV1 kimutatása immunhisztokémiával és immunfluoreszcenciával

A vázizom – *m. gracilis* – szövetmintákat Tissue-Tek O.C.T. oldatban ágyztuk be (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) folyékony levegőben történő fagyasztással. A 10 µm vastagságú cryostat metszeteket Shandon Superfrost Plus adhezív tárgylemezre (Thermo Electron, Watham, MA, USA) helyeztük, 10 percig acetóban fixáltuk, majd 20 percig kecske normál-szérum (1,5%, Sigma, St. Louis, MO, USA) tartalmú PBS-ben blokkoltuk. A festéseket szobahőn végeztük. Elsődleges antitestként nyúlban termeltetett anti-kapszaicin receptor antitestet (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) használtunk, 1 % BSA-t tartalmazó PBS-ben, 1:100 hígításban, 1 órán át. Mosási lépéseket követően a metszeteket Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) kit blokkoló pufferben hígított, 1:200 hígítású, biotinilált anti-nyúl antitestjével inkubáltuk 30 percig, majd a kit avidin tartalmú, 1:50 hígítású A+B komponensével ismét 30 percig. Az immunkomplexeket Vector VIP szubsztráttal (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) tettük láthatóvá, a gyártó utasításainak megfelelően. Végül a metszeteket metil-zölddel is megfestettük, a sejtmagok megjelenítése érdekében. Az immunfluoreszcens detekció érdekében a fentiekhez hasonlóan jártunk el, az alábbi különbségekkel: második antitestként 1:100 hígítású, blokkoló pufferben hígított, FITC-konjugált, kecskében termeltetett anti-nyúl antitestet (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) használtunk. A simaizom-réteg megjelenítésére 1:50 hígítású, 1 % BSA-t tartalmazó PBS-ben hígított, monoklonális, egérben termeltetett, simaizom-aktin ellenes antitestet (Novocastra, New Castle, UK), majd 1:100 hígítású, blokkoló pufferben hígított, Texas Red-konjugált, kecskében termeltetett anti-egér antitestet (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA,

USA) használtunk. Valamennyi antitesttel szobahőn, 1 órán át történtek az inkubálások. Végül a metszeteket, a sejtmagok láthatóvá tétele érdekében, DAPI-t tartalmazó Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) fedőmédiummal fedtük le.

A TRPV1 expressziójának igazolása RT-PCR segítségével

Patkány aorta homogenizátumból, valamint tenyésztett A7r5 simaizom sejtekből RNeasy RNS izoláló kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) segítségével mRNS-t izoláltunk, majd ebből a templátból RevertAid H Minus kit (Fermentas UAB, Vilnius, Lithuania) alkalmazásával teljes hosszúságú cDNS-t szintetizáltunk. Az így előállított cDNS-ben vizsgáltuk a TRPV1-et kódoló szekvencia előfordulását. A felhasznált TRPV1 sense primer szekvenciája: 5' – CTA CCT GGA ACA CCA ATG TGG G – 3', míg az antisense szekvencia: 5' – GCT GGG TGG CAT GTC TAT CTC G – 3' volt (Sigma, Steinheim, Germany). A TRPV1 esetében, a specifitás érdekében, a primer tervezése során olyan szekvenciát választottunk ki, amely a genomi DNS-ből kiindulva elvileg egy 596 bp – kísérleteinkben nem láttuk –, míg cDNS-ből kiindulva egy 149 bp méretű terméket eredményez. Konstitutívan expresszáldó génnek a glicerol-aldehidfoszfát-dehidrogenáz (GAPDH) génjét használtuk, esetében a sense primer : 5' – CTC CCT CAA GAT TGT CAG CAA – 3', az antisense pedig: 5' – CAG ATC CAC AAC GGA TAC ATT – 3' volt. A GAPDH mRNS-éből kiindulva ezzel a protokollal egy 269 bp méretű produktum keletkezik (100). A PCR elegy (25 µl) összetétele: 1 µl cDNS, 1 µM mindkét primerből, 200 µM dNTP, 6 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3) és 2,5 U Long PCR Enzyme Mix (Fermentas UAB, Vilnius, Lithuania) enzimet tartalmazott. A 94 °C-os 5 perces tartó kezdő denaturáció után 35 ciklus következett, mely az alábbi lépésekből állt: 20 s 94 °C-on, 20 s 58 °C-on és 40 s 72 °C-on. A reakciót

egy 5 perces inkubáció zárta 72 °C-on. A PCR-termékeket mindkét esetben 5% poliakrilamid gélen futtattuk meg, és etidium-bromid festéssel tettük láthatóvá.

A CHO-TRPV1 sejtek tenyésztése

A szelektált, stabil, TRPV1 expresszáló CHO sejtklónt (Tet-Off indukált CHO-TRPV1 sejtek) (101) fenntartó médiumban tenyésztettük (F12 médium kiegészítve 10% FBS-sel, 25 mM HEPES-sel (pH 7,5), 250 µg/ml geneticin-nel (Life Technologies Inc., Rockville, MD, USA), és 1 mg/l tetracyclin-nel (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)).

A $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -uptake kísérletekhez a CHO-TRPV1 sejteket 24-lyukú plate-en tenyésztettük, úgy, hogy 20-40%-os konfluenciával jellemezhető sejtdenzitást érjünk el. A TRPV1 expresszió indukciójának érdekében a médiumot tetracyclin-mentes tápoldatra cseréltük a következő napon. A kísérleteket körülbelül 48 órával az indukció után végeztük.

Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció mérésekhez a CHO-TRPV1 sejteket 25 mm-es kerek üveg fedőlemezekre helyeztük fenntartó médiumban. Másnap a médiumot indukáló tápoldatra cseréltük – összetétele hasonló a fenntartó médiuméhoz, de tetracyclin helyett 1 mM nátrium-butirátot tartalmaz –, hogy TRPV1 expressziót indukáljunk. A kísérleteket körülbelül 24 órával az indukció után végeztük.

$^{45}\text{Ca}^{2+}$ -uptake kísérletek

A kísérleteket egy korábbi leírásnak megfelelően végeztük (102). A CHO-TRPV1 sejteket közvetlenül a CO_2 inkubátorból való kivétel után felhasználtuk. Esetenként a sejteket előinkubáltuk 100 nM 4 α -forbol 12-mirisztát 13-acetáttal (PMA), és/vagy 100 nM CY-A-val. A Ca^{2+} -uptake mérésekhez a sejteket 5 percig 37°C-on inkubáltuk 500 µl

szérum-mentes, 0,25 mg/ml BSA (Sigma, St. Louis, MO, USA) tartalmú DMEM-ben (Life Technologies, Rockville, MD, USA, tartalmaz 1,8 mM CaCl_2 -ot), melyhez 1 $\mu\text{Ci/ml}$ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -ot (ICN, Costa Mesa, CA, USA) adtunk. A maximális választ ugyanazon a plate-en 300 nM kapszaicin által kiváltott válaszként határoztuk meg. Közvetlenül az inkubálás után az extracelluláris $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -t a sejtek 1,8 mM CaCl_2 -t tartalmazó hideg DPBS-ben (Life Technologies Inc., Rockville, MD, USA,) való háromszori mosásával távolítottuk el. Ezután, az internalizálódott $^{45}\text{Ca}^{2+}$ mennyiségének mérése érdekében a sejteket 400 μl /lyuk RIPA pufferrel (50 mM Tris-Cl pH 7,4; 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 1% Na-deoxycholát) lizáltuk. A plate-et a lízis után lassan, 20 percen keresztül ráztuk, majd minden egyes lyukból 300 μl sejt-lizátumot szcintillációs küvettába mértünk, a radioaktivitást pedig szcintillációs számlálóval mértük. Minden kísérletből, minden adatpontban négy lyukból származó mintát elemeztünk az individuális kísérletekben, és a statisztikai értékeléshez minden kísérletet legalább háromszor elvégeztünk. Az adatokat a Hill-egyenlet komputeres illesztésével elemeztük.

Intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció mérések

A kísérleteket egy korábban leírt módszer szerint végeztük (81). Röviden, a CHO-TRPV1 sejteket 2 órára Ca^{2+} tartalmú (1,8 mM) DPBS-be tettük, mely 1 mg/ml BSA-t és 5 μM FURA2-AM-t tartalmazott (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). A sejteket ezt követően a mérésekig szobahőn, sötétben, fenntartó médiumban tartottuk. A méréseket Ca^{2+} tartalmú (1,8 mM) DPBS-ben végeztük. Az individuális sejtek fluoreszcenciáját InCyt Im2 fluoreszcencia imaging rendszerrel mértük (Intracellular Imaging, Cincinnati, OH, USA). A sejteket alternálva 340 és 380 nm-en világítottuk meg. Az 510 nm-nél nagyobb hullámhosszúságú emittált fényt mértük. Az adatokat InCyt 4.5 software-rel

elemztük és Excel (Microsoft) valamint GraphPad Prism 2.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA.) programokkal dolgoztuk fel.

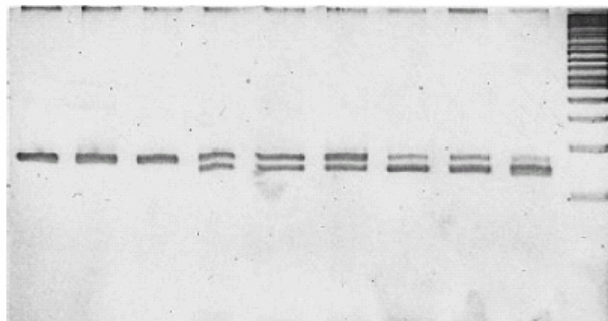
EREDMÉNYEK

Új PCR-RFLP módszer az AGT M235T polimorfizmusának meghatározásához

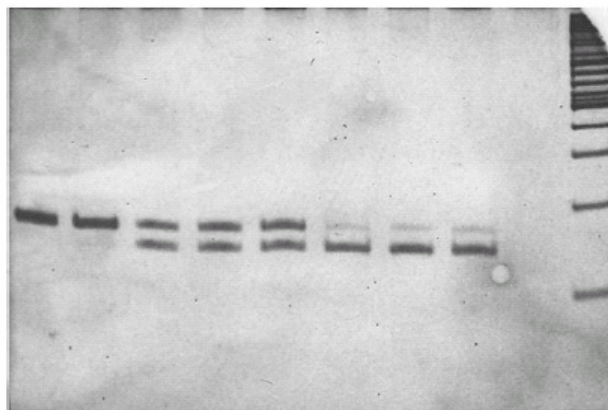
A renin-angiotenzin rendszer genetikai vizsgálata során problémákat tapasztaltunk az AGT-gén M235T genotipizálásával kapcsolatban. Az eljárás (56) beállítása folyamán a PCR-reakciót optimalizáltuk a mi rendszerünkben, és azt találtuk, hogy 59°C-os hőmérséklet optimális a hibridizációhoz. Az egyes genotípusok meghatározásához a PCR-reakciót a Tth 111 I enzimmel végzett restrikciós emésztés követte (1.A ábra). A vizsgált 123 páciens között azonban nem találtunk TT genotípusút (1. táblázat), annak ellenére, hogy az M allél frekvenciája 0,634-nek, a T allél pedig 0,366-nak adódott és így TT genotípussal $0,366 \times 0,366 \times 123 = 16,48 \approx 16$ egyénnek kellett volna rendelkeznie (feltételezve, hogy a populáció a Hardy-Weinberg egyensúlyban van). Az adatok statisztikai feldolgozása arra utalt, hogy a meghatározott allélfrekvenciák nem reprezentálnak egy Hardy-Weinberg egyensúlyban lévő populációt (Chi-négyzet próbával meghatározva $p < 0,01$, szignifikáns eltérés a várt értékektől). Ez a tény a korábban leírt allélfrekvenciákat figyelembe véve (56) vagy a PCR-amplifikációban, vagy a restrikciós emésztésben rejlő technikai problémákat sugallt.

Hogy kiküszöböljük a félretipizáláshoz vezető lehetséges problémákat, először egy magasabb hibridizációs hőmérsékletet alkalmaztunk – 64°C –, ezáltal növelve a PCR-reakció specifikusságát (1.B ábra). Ekkor hatékonyabb restrikciós emésztést tapasztaltunk, de az AGT-fragmentumok teljes hasítását így sem sikerült elérnünk. A restrikciós hasítás ellenőrzése érdekében a Tth 111 I restrikciós enzim mellett az ugyanazon szekvenciát hasító Pst I-et is használtuk, de teljes emésztést így sem sikerült elérnünk.

A U 1 2 3 4 5 6 7 8 Standard



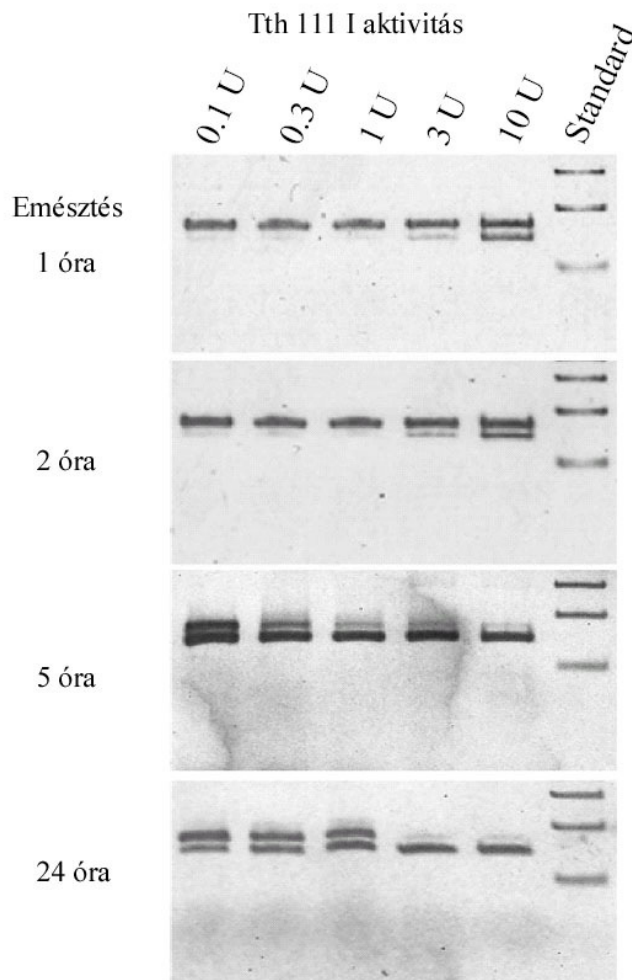
B 1 2 3 4 5 6 7 8 Standard



1. ábra Az AGT M235T polimorfizmus meghatározása.

Beteg DNS mintákból (1-8) 59°C (A) és 64°C (B) annealing hőmérséklet mellett szaporítottuk fel az AGT-re jellemző szakaszt, melyet Tth 111 I restrikciós enzimmel hasítottunk. U az emésztetlen PCR terméket jelöli. Az ábra jobb oldalán a méret meghatározásához használt 100 bp DNA Ladder standard látható.

A 8. beteg DNS mintáját felhasználva, különböző emésztési időtartamok és enzimkoncentrációk mellett vizsgáltuk a hasítás kinetikáját és hatékonyságát (2. ábra). A hosszabb időtartammal és magasabb enzimaktivitással párhuzamosan, egyértelműen látható volt egy tendencia az egyre tökéletesebb hasítás irányába. Teljes emésztődést azonban továbbra sem értünk el.

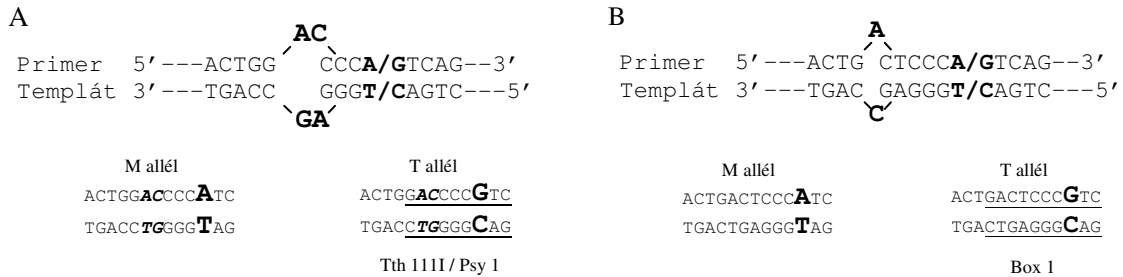


2. ábra A Tth 111 I restrikciós emésztés optimalizálása.

A DNS-ből (8. minta) felszaporított AGT-re jellemző szakaszt különböző Tth 111 I aktivitás (0,1-10 U) és időtartam (1-24 óra) mellett hasítottunk. Az ábra jobb oldalán a méret meghatározásához használt 100 bp DNA Ladder standard látható.

Az AGT M235T polimorfizmus pontosabb meghatározása érdekében ezért kidolgoztunk egy módosított PCR-RFLP protokollt. Sajnálatos módon az eredeti, Russ és munkatársai által kidolgozott eljárás (56) óta sem vált hozzáférhetővé olyan restrikciós enzim, amely az M235T polimorfizmus kialakításáért felelős nukleotid szekvenciában képes lenne hasítani. Ugyanakkor a Box I enzim által felismert restrikciós hely létrehozása csak egyetlen bázis inzercióját teszi szükségessé az eredeti protokoll két

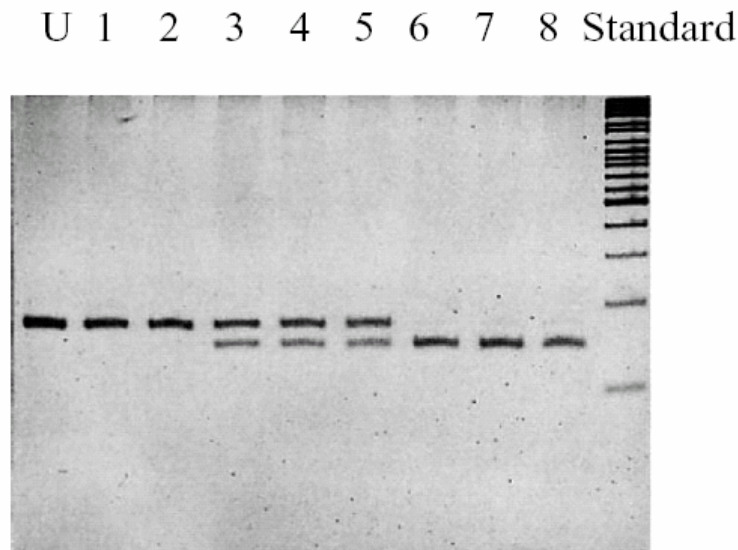
bázispáros módosításával szemben. Így egy új primert terveztünk, amelyben egyetlen mismatch alkalmazásával kialakítottunk egy új Box I restrikciós helyet (3. ábra).



3. ábra Új primer tervezése, Box I restrikciós hely létrehozása

Az A panelen az eredeti, a B panelen az általunk módosított protokoll sémája látható. Kiemelve jelöltük a primerek és a templátok esetében a mismatch-eket, valamint aláhúzással a restrikciós enzimek hasítási szekvenciáit

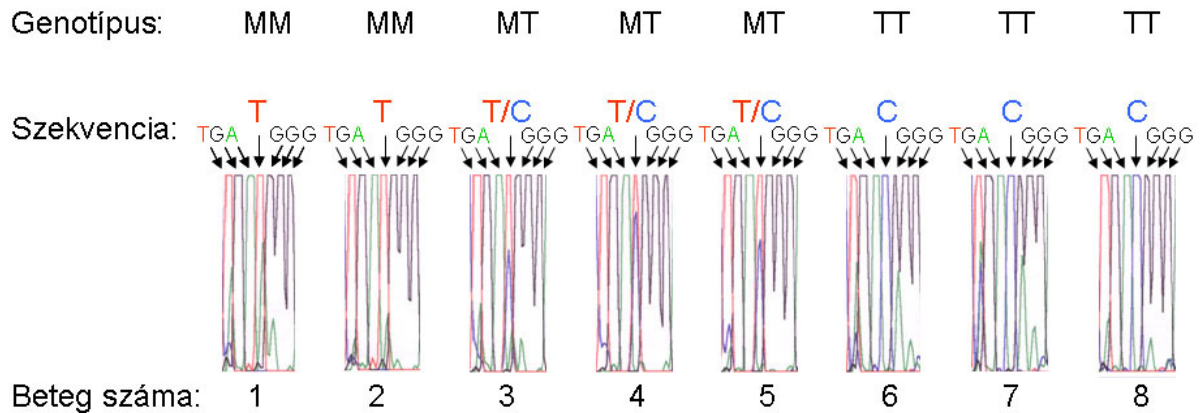
A PCR reakció új primerrel történő optimalizálását követően a Box I emésztés teljes hasítást okozott (4. ábra).



4. ábra Az AGT M235T PCR-RFLP analízisének eredménye a módosított protokollal

Beteg DNS mintákból (1-8) a módosított protokollal szaporítottuk fel az AGT-re jellemző szakaszt, melyet Box I restrikciós enzimmel hasítottunk (U: hasítatlan PCR termék). Az ábra jobb oldalán a méret meghatározásához használt 100 bp DNA Ladder standard látható.

Az így meghatározott genotípusok ellenőrzése érdekében a fenti kísérletekben felhasznált PCR termékeket szekvenálással is vizsgáltuk (5. ábra). A szekvenálás megerősítette a PCR-RFLP analízisben kapott genotípusukat (1-2: MM, 3-5: MT, 6-8: TT).



5. ábra A vizsgált DNS minták szekvenciájának meghatározása direkt szekvenálással

A 123 páciens DNS-mintáját újrazsgálva az eredeti protokollal szemben 33 MM, 56 MT és 34 TT genotípust találtunk (1. táblázat). Az új módszerrel gyűjtött adatok statisztikai analízise alapján az M allél frekvenciája 0.4959-nek, a T allél pedig 0.5041-nek adódott. Ezek az allélfrekvenciák egy Hardy-Weinberg equilibriumban lévő populációt reprezentálnak (Chi-négyzet próbával meghatározva $p > 0,5$, nincs szignifikáns eltérés a várt értékektől).

	MM genotípus	MT genotípus	TT genotípus
Eredeti módszer	33	90	0
Módosított módszer	33	56	34

1. táblázat Az AGT M235T polimorfizmus meghatározásának eredménye.

A renin-angiotenzin rendszer (RAS) polimorfizmusok és az in-stent restenosis (ISR) kapcsolata

A vizsgálni kívánt genetikai polimorfizmusok (ACE I/D, AGT M235T, AT1R A1166C) meghatározására alkalmas módszerek kidolgozását követően 239 koszorúsérszűkületben szenvedő beteget vontunk be a vizsgálatba. A vizsgált populáció legfőbb jellemzői a 2. táblázatban vannak feltüntetve. Összességében 330 szűkületbe 347 stentet ültettek be. Angiológiai ISR (50 %-osnál nagyobb szűkület) 116 pácinesben alakult ki (48.5%). Az átlagéletkor, a vérnyomás-státusz, a plazma lipid profil, korábbi miokardiális infarktus és diabetes mellitus előfordulása, valamint a gyógyszeres kezelés tekintetében nem volt szignifikáns különbség a restenosisos és nem-restenosisos csoport között. Nem mutatott különbséget a két csoport a szűkületek kiterjedése, a léziók három fő koszorúsér közötti megoszlása, és olyan procedurális tényezők, mint a stent hossza és típusa, vagy előtágítás alkalmazása, között sem.

	In-stent restenosisos csoport (N=116)	Nem restenosisos csoport (N=123)	p
Életkor (évek)	59.4±9.4	58.4±9.4	0.38
Férfi/Nő	74/42	81/42	0.84
Diabetes mellitus (%)	32 (27.6%)	28 (22.8%)	0.47
Hyperlipidemia (%)	107 (92.2%)	106 (86.2%)	0.19
Hypertónia >140/90 Hgmm (%)	73 (62.9%)	75 (60.9%)	0.86
Aktív dohányos (%)	41 (35.3%)	48 (39.0%)	0.78
Kezelés ACEI-vel vagy ARB-vel (%)	99 (88.2%)	107 (87.0%)	0.81
Kezelés statinnal (%)	96 (86.8%)	100 (81.3%)	0.14
Korábbi MI (%)	63 (54.3%)	84 (68.3%)	0.47
A követés átlagos időtartama (hónap)	6.9	9.2	0.07
Stenosisok száma	163	167	
Multiplex stenosisok (%)	40 (34.5%)	41 (33.3%)	0.96
Predilatáció (%)	102 (57.6%)	92 (54.1%)	0.58
Érintett ér			
LAD	78 (47.9%)	74 (44.3%)	0.59
CX	42 (25.8%)	34 (20.4%)	0.30
RCA	43 (26.4%)	59 (35.3%)	0.10
A stenosis mértéke PCI előtt (%)	86.5±12.8	84.6±10.8	0.23
Átlagos stent hosszúság (mm)	15.99±0.39	15.35±0.36	0.24

2. táblázat Az in-stent restenosisos és a nem-restenosisos csoport klinikai jellemzői és a rizikófaktorok megoszlása

ACEI: angiotenzin konvertáz enzim inhibitor; ARB: angiotenzin receptor blokkoló, CX: körbefutó koszorúsér, LAD: bal elülső leszálló koszorúsér, MI: miokardiális infarktus, PCI: perkután koronária intervenció, RCA: jobb koszorúsér

A teljes populációban megfigyelt allél-frekvenciák nem tértek el szignifikánsan a Hardy-Weinberg equilibriumtól (ACE I: 0,44, D: 0,56 $p>0,1$; AGT M: 0,53, T: 0,47 $p>0,1$; AT1R A: 0,72, C: 0,28 $p>0,9$), ami a genetikai egyensúly jele. Nem voltak jelentős különbségek az egyes genotípusok megoszlásában sem (3. táblázat). Az ACE II, ID and DD genotípusok megoszlása 24,2%, 40,5% and 35,3% az ISR csoportban, míg 20,3%, 45,5% és 34,2% a nem-ISR csoportban ($p=0,80$). Az AGT M235T polimorfizmus esetében a genotípusok (MM, MT, TT) előfordulása 26,7%, 50,9% és 22,4% volt a

restenosisos, míg 31,7%, 43,1%, és 25,2% volt a nem-restenosisos betegekben ($p=0,96$). A különböző AT1R (AA, AC, CC) genotípusok előfordulásában sem találtunk szignifikáns különbséget: a különböző genotípusok előfordulási gyakorisága 50,9%, 38,8% és 10,3% volt a restenosisos, valamint 52%, 41,5% és 6,5% a nem restenosisos csoportban ($p=0,65$).

Genotípus	In-stent restenosisos csoport (N=116)	Nem-restenosisos csoport (N=123)	<i>p</i>
ACE genotípus			
II	28 (24,1%)	25 (20,3%)	0,80
ID	47 (40,5%)	56 (45,5%)	
DD	41 (35,3%)	42 (34,1%)	
AGT M235T genotípus			
MM	31 (26,7%)	39 (31,7%)	0,96
MT	59 (50,9%)	53 (43,1%)	
TT	26 (22,4%)	31 (25,2%)	
AT1R genotípus			
AA	59 (50,9%)	64 (52,0%)	0,65
AC	45 (38,8%)	51 (41,5%)	
CC	12 (10,3%)	8 (6,5%)	

3. táblázat A genotípusok megoszlása az in-stent restenosisos és a nem-restenosisos csoportban

ACE: angiotenzin konvertáz enzim; AGT: angiotenzinogén; AT1R: angiotenzin II 1 típusú receptor

Mindezek mellett logisztikus regresszió analízissel – kiegészítve számos más paraméterrel, mint az életkor, a nem, vérnyomás-státusz, a lipid profil, diabetes mellitus jelenléte vagy procedurális tényezők – sem sikerült kimutatni összefüggést egy bizonyos genotípus és a kontroll angiográfián látott lumenátmérő csökkenés foka között (4. táblázat). Ezzel szemben a hagyományosan ismert rizikófaktorok közül a korábban elszenvedett miokardiális infarktusról igazolódott, hogy hatással van a lumen beszűkülésére.

Változó	Odds ráció	<i>p</i>	CI (95%)
Életkor	0,98	0,38	0,95 1,01
Nem	0,90	0,72	0,51 1,59
EF (%)	0,99	0,56	0,96 1,02
Diabetes mellitus	0,79	0,49	0,41 1,52
Hypercholesterinaemia	0,51	0,13	0,21 1,22
Hypertriglyceridaemia	0,94	0,75	0,67 1,33
Hypertónia	1,12	0,70	0,61 2,06
Korábbi MI	1,91	0,04*	1,01 3,61
ACEI/ARB kezelés	1,02	0,74	0,87 1,20
A lézió átmérője	0,97	0,09	0,95 1,00
Többér betegség	0,91	0,63	0,62 1,32
Predilatáció	0,86	0,61	0,48 1,53
Stent hosszúság	0,88	0,72	0,87 1,15

4. táblázat A genotípusok megoszlása az in-stent restenosisos és a nem-restenosisos csoportban

ACEI: angiotenzin konvertáz enzim inhibitor; ARB: angiotenzin receptor blokkoló, CI: konfidencia intervallum, EF: ejekciós frakció, MI: miokardiális infarktus,

A génpolimorfizmusok szinergista hatásának tisztázása érdekében, kiválasztottuk azokat a betegeket, akik az itt vizsgált genetikai polimorfizmusok közül valamennyi, kardiovaszkuláris betegségekre hajlamosítónak ismert kombinációt hordozták, azaz legalább egy ACE D, egy AGT T és egy AT1R C alléllal rendelkeztek. Összehasonlítva őket az összes többi pácienssel, ismét nem találtunk különbséget az ISR prevalenciájában (5. táblázat).

	In-stent restenosisos csoport (N=116)	Nem-restenosisos csoport (N=123)	<i>p</i>
ID/DD+MT/TT+AC/CC	30 (25,8%)	30 (24,4%)	0,79
Többi genotípus	86 (74,2%)	93 (75,6%)	

5. táblázat A D, T és C allélok szinergista hatása a restenosis kialakulására

Az anandamid és a kapszaicin vazoaktív hatása

Az anandamid és a kapszaicin vazoaktív hatását patkány vázizom (m. gracilis) rezisztencia ereken (érátmérő 80 Hgmm-en 132-223 μm) mértük, perfúziós miográf-rendszerben. Az izolált arteriolák spontán miogén tónust fejlesztettek ki (miogén konstriktió: $25 \pm 4 \%$; érátmérő: Ca^{2+} jelenlétében: $179 \pm 33 \mu\text{m}$ és Ca^{2+} hiányában: $234 \pm 20 \mu\text{m}$, $n=15$, $p<0,01$). Minden egyes kísérlet elején az endotélium épségét acetilkolinnal teszteltük (10^{-7} M, $95 \pm 13 \%$ dilatáció, $n=15$), míg a simaizom-funkciót norepinefrin hozzáadásával ellenőriztük (10^{-7} M, $31 \pm 14 \%$ konstriktió, $n=15$) (6. táblázat).

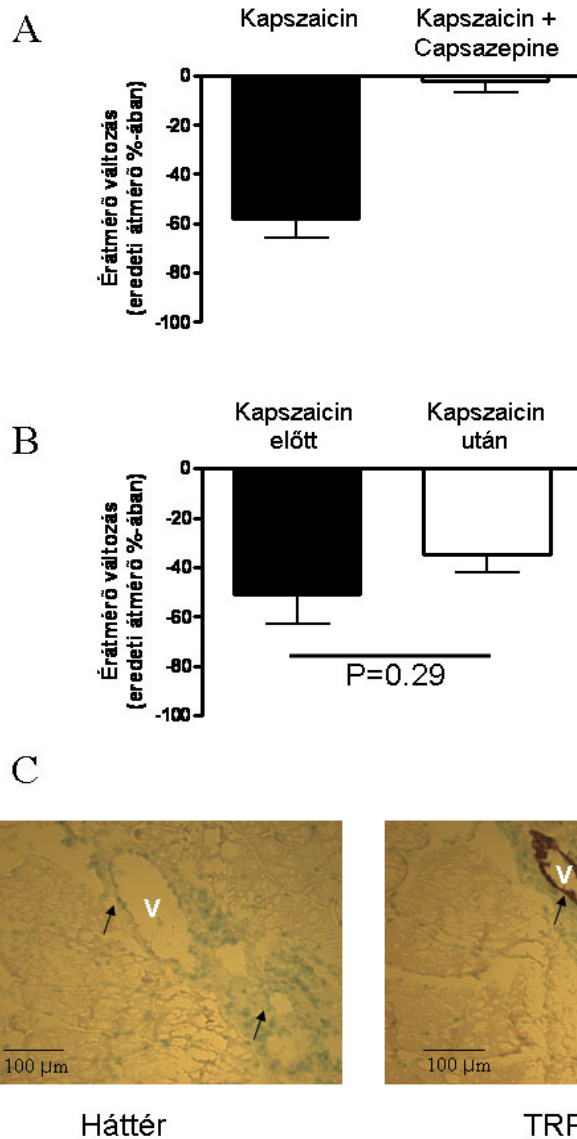
	Érátmérő (μm) vagy Érátmérő változás (a maximum %-ában)
Ca^{2+} tartalmú oldatban 80 Hgmm-en	$179 \pm 33 \mu\text{m}$
Ca^{2+} nélkül 80 Hgmm-en	$234 \pm 20 \mu\text{m}$
Miogén konstriktió	$25 \pm 4 \%$
100 nM acetilkolin-mediált dilatáció	$95 \pm 13 \%$
100 nM norepinefrin-mediált konstriktió	$31 \pm 14 \%$
100 μM anandamid	$3 \pm 5 \%$
1 μM kapszaicin mediált konstriktió	$51 \pm 12 \%$

6. táblázat A kanulált, perfundált arteriolák jellemző adatai

Az ép endotél és simaizom funkcióval rendelkező ereken először a TRPV1 stimuláció hatását vizsgáltuk. A kapszaicin (1 μM) $58 \pm 8 \%$ konstriktiót okozott ($n=5$), amit a kompetitív TRPV1 antagonistá capsazepin felfüggesztett (10 μM , $2 \pm 5 \%$ konstriktió, $n=5$, $p<0,01$), ami a kapszaicin hatás TRPV1 specifikus voltára utal (6.A ábra). Ismert, hogy a TRPV1 gyakran deszenzitizálódik tartós agonista kezelés hatására, így vizsgáltuk az ismételt kapszaicin stimuláció hatását. 20 perces folyamatos kapszaicin

kezelés (1 μ M, maximális konstriktió: 51 ± 12 %) nem deszenzitizálta szignifikánsan a TRPV1-et (maximális konstriktió 40 perccel később: 35 ± 7 %, (n=5), p=0,29, 6.B ábra).

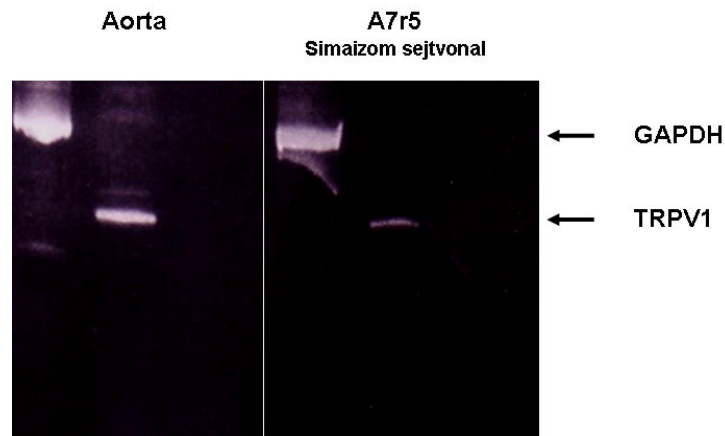
A TRPV1 vázizomerekben történő expressziójának vizsgálatára immunhisztokémiai módszert alkalmaztunk, ami intenzív TRPV1-szerű festődést tárt fel a vázizom erekben (6.C ábra).



6. ábra A kapszaicin mediált vazokonstriktió specificitásának igazolása

Izolált vázizom arteriolák 1 μ M kapszaicinre adott válasza látható a TRPV1 specifikus antagonistá capsazepine nélkül (A panel, első oszlop, n=5) vagy capsazepine jelenlétében (10 μ M, második oszlop, n=5). A kapszaicin mediált deszenzitizáció vizsgálata során (B panel) az ereket 20 percig, 1 μ M kapszaicinnal inkubáltuk, melyet egy 40 perces regenerációs periódus követett. Az első kapszaicin stimuláció által kiváltott konstriktió nagyságát mutatja a bal oldali oszlop, míg a regenerációt követően újra mért kapszaicin hatását a jobb oldali oszlop szemlélteti. Végül a TRPV1 expressziót immunhisztokémiai technikával vizsgáltuk (C panel). A kísérletek során patkány m. gracilis izmának egymást követő metszeteit használtuk. A TRPV1 festésére egy nyúlban termeltetett TRPV1 specifikus antitestet használtunk (hígítás: 1:100; Calbiochem) és a TRPV1 festődést Vector VIP szubsztráttal tettük láthatóvá. Az első antitest elhagyásával kapott kép szolgált háttérként. Az erek lumenét a képeken V-vel, míg a simaizomréteget nyilakkal jelöltük.

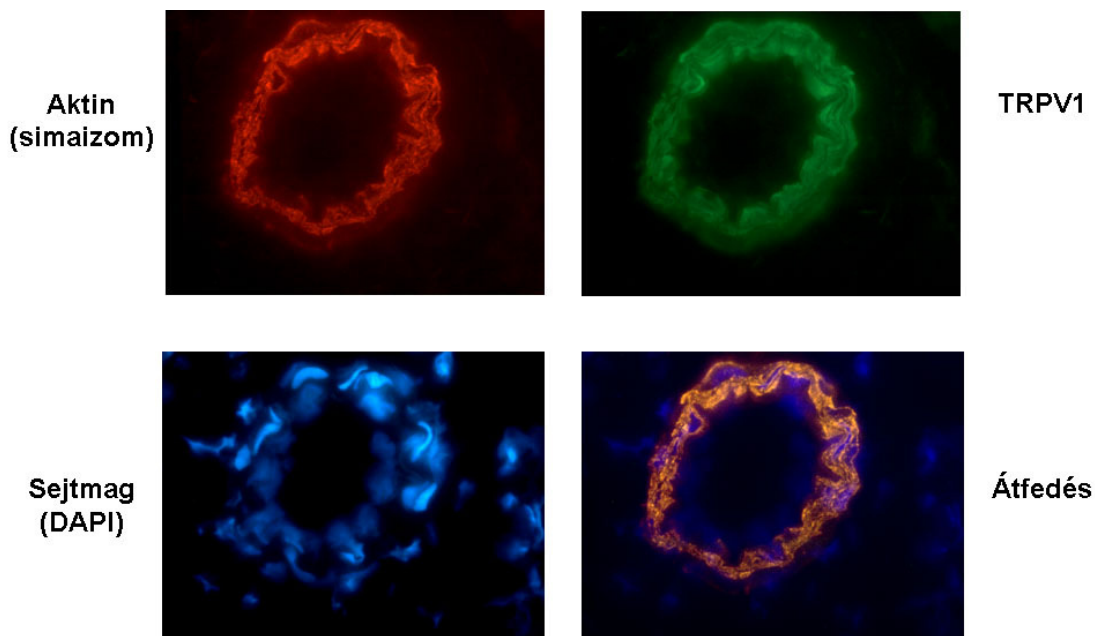
Tekintettel arra, hogy a kapott festődés leginkább a simaizom sejtekre jellemzőnek bizonyult, kísérletet tettünk a simaizomsejtek TRPV1 expressziójának specifikus vizsgálatára. A TRPV1 simaizom expresszióját először RT-PCR segítségével mRNS szinten vizsgáltuk (7. ábra). A TRPV1 expresszióját sikerült kimutatnunk mind aortából, mind tenyésztett vaszkuláris simaizomsejtekből (A7r5 sejtek).



7. ábra TRPV1 mRNS kimutatása RT-PCR módszerrel

GAPDH: glicerol-aldehidfoszfát-dehidrogenáz, TRPV1: vanilloid receptor, A7r5: simaizom sejtvonala. A géleken az első oszlopba a GAPDH, míg a második oszlopba a TRPV1 specifikus PCR termékeket vittük fel.

Annak igazolására, hogy a vázizom arteriolában is a simaizomsejtek expresszálják a TRPV1-et, immunfluoreszcens vizsgálatokat végeztünk (8. ábra). A *m. gracilis*-ből származó arteriolában a simaizom eredetű aktin és a TRPV1 festődése jelentős átfedést mutatott, ami ebben a rendszerben is alátámasztotta a TRPV1 simaizomsejtekben történő expresszióját.

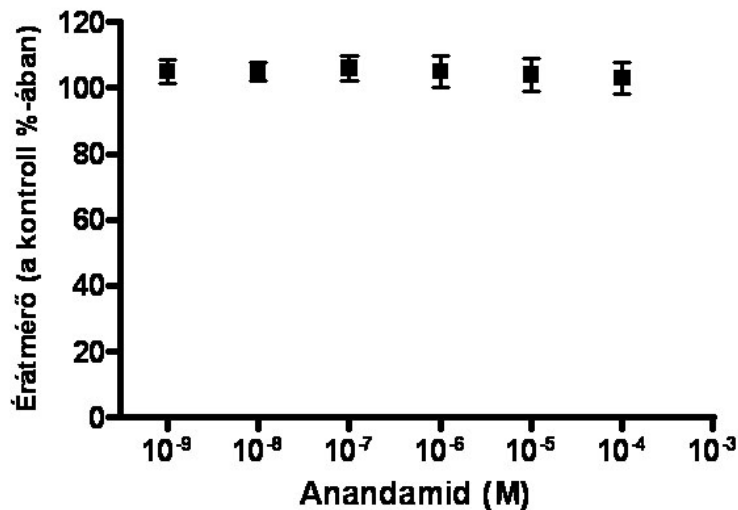


8. ábra A TRPV1 expressziója vaszkuláris simaizomsejtekben

Patkány m. gracilis metszetet inkubáltunk simaizom aktin elleni antitesttel (monoklonális, hígítása 1:50, Novocastra), melyet Texas Red jelzett anti egér antitesttel mutattunk ki (hígítása 1:100, Jackson, bal felső kép). A TRPV1 expresszió párhuzamos kimutatására ugyanezt a metszetet TRPV1 elleni antitesttel (nyúlban termeltetett, hígítása 1:100, Calbiochem) inkubáltuk, melyet FITC jelzett másodlagos antitesttel (hígítás: 1:100, Vector) tettünk láthatóvá (jobb felső kép). A magok kimutatására (bal alsó kép) DAPI tartalmú Vectashield fedőanyagot alkalmaztunk. A kolokalizáció megítélésére mindhárom képet egymásra vetítettük (jobb alsó ábra).

Az az eredmény, hogy a TRPV1 specifikus agonista kapszaicin konstriktiót hozott létre a vázizom ereken, szöges ellentétben állt a mezenteriális ereken korábban megfigyelt vazodilatációs válasszal (92;93). Annak ellenőrzésére, hogy az általunk kapott fiziológias hatás nem műtermék, mezenteriális ereket is vizsgáltunk. Ezeken mind a kapszaicin, mind az anandamid koncentráció függő dilatációt váltott ki, igaz, a kapszaicin hatékonysága szignifikánsan nagyobb volt (maximális dilatáció kapszaicinnal $96,3 \pm 2,1$ %, maximális dilatáció anandamiddal $23,6 \pm 3,3$ %, $n=5$, $p<0,01$). Ezen adatok megegyeztek a korábban leírtakkal (66;75;91-93).

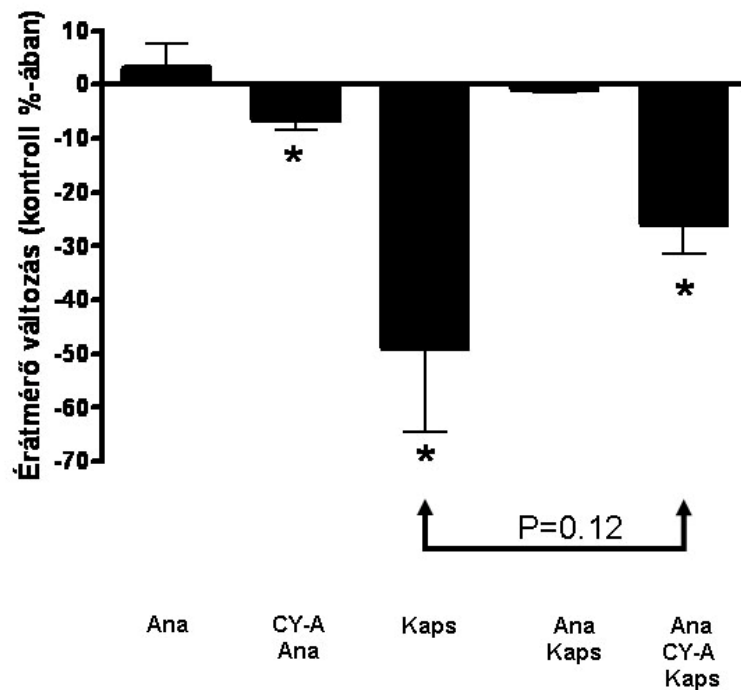
Az anandamid vázizom erek átmérőjére gyakorolt hatását kumulatív dózis-hatás mérésekkel teszteltük. 1 nM és 100 μ M közötti tartományban, 1 perces inkubálásokat követően nem tapasztaltunk szignifikáns változást az érátmérőben (9. ábra, maximális hatás 3 ± 5 % dilatáció), a kontrollhoz viszonyítva.



9. ábra Az anandamid dózis-hatása vázizomerek átmérőjére
Az anandamid kumulatív dózis-hatása 1 perces inkubációk esetén.

Korábbi vizsgálatok alapján az anandamid deszenzitizálhatja a TRPV1-t (76;82;103-105). Ezért rendszerünkben vizsgáltuk 30 μ M anandamid – 20 percen keresztül, 40 perces regenerációs periódussal követve – hatását a TRPV1 válaszkésztségre (10. ábra). 1 μ M kapszaicin az erek szignifikáns konstriktóját okozta (konstriktió 51 ± 12 %, $n=5$, $p=0,018$). A kapszaicin-indukált vazokonstriktiót az anandamid előkezelés (30 μ M) teljesen megszüntette (konstriktió $1 \pm 0,6$ %, $n=5$). Az anandamid TRPV1-re gyakorolt gátló hatását a calcineurin – protein-foszfataz 2B – inhibitor cyclosporin-A (100 nM) visszafordította (konstriktió kapszaicin-re 31 ± 1 %, $n=4$, $p=0,014$ a

konstrukcióra, nincs szignifikáns különbség az önmagában alkalmazott kapszaicin választól, $p=0,12$). Sőt, az anandamid szignifikáns konstrukciót okozott (maximális konstrukció $7 \pm 2 \%$, $n=4$, $p=0,01$), abban az esetben, amikor 100 nM CY-A-t követően – 5 perces előkezelés – alkalmaztuk. A CY-A önmagában nem befolyásolta az érátmérő alakulását (1 és 1000 nM között, $n=5$, nincs ábrázolva).



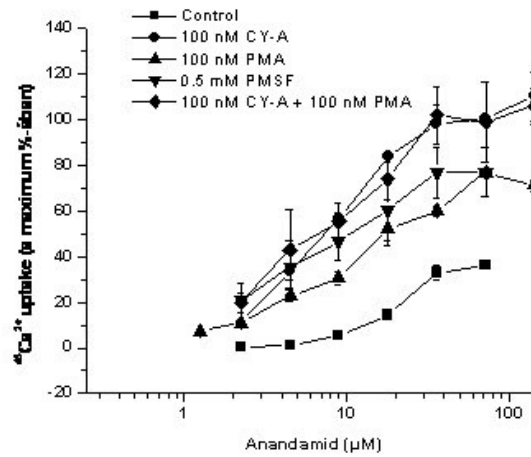
10. ábra A TRPV1 válaszkészségének szabályozása anandamid mediált deszenzitizációval

Vázizom arteriolákat stimuláltunk anandamiddal (Ana, 30 μM) és kapszaicinnel (Kaps, 1 μM). Az anandamid hatását meghatároztuk 5 perces 100 nM-os cyclosporin-A (CY-A) előkezelés után is (Ana + CY-A), hasonlóképpen a kapszaicin hatását is meghatároztuk 20 perces anandamiddal történő inkubációt követően (Ana + Kaps). A 20 perces anandamiddal történő inkubáció során kiváltott deszenzitizáció reverzibilitását is vizsgáltuk CY-A segítségével (100 nM, alkalmazva a 40 perces reszenzitizációt követően 5 percig) a kapszaicin válaszkészség mérésével (Ana + CY-A + Kaps).

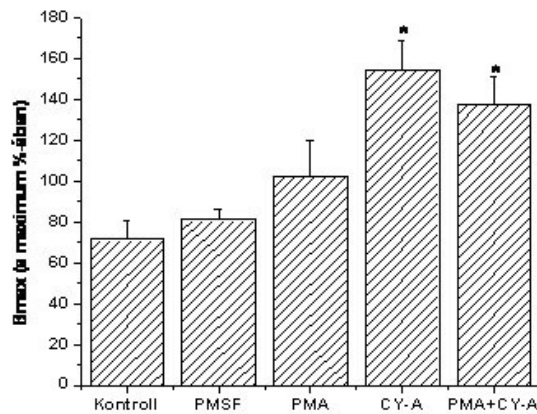
A TRPV1 vázizom arteriolákon tapasztalt, foszforiláció-dependens, anandamid-mediált deszenzitizációjának lehetséges mechanizmusainak feltárására egy exogén,

TRPV1 expresszálo sejt vonalat használtunk (81;102;105). A $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -uptake mérések (11. ábra) arra utáltak, hogy az anandamid parciális agonistaként viselkedik ebben a rendszerben (maximális hatás a 300 nM kapszaicin által indukált hatás $65 \pm 8 \%$ -a, $n=7$). Ezt a parciális agonizmust a PKC aktiválása PMA-val (100 nM, $98 \pm 14 \%$, $n=3$, $p=0,059$), vagy a foszfatáz 2B gátlása cyclosporin-A-val (100 nM, $145 \pm 14 \%$, $n=5$, $p<0,001$), vagy mindkét ágens együttes alkalmazása ($137 \pm 13 \%$, $n=3$, $p=0,001$) teljes agonizmussá alakíthatja át. A maximális hatással párhuzamosan a látszólagos K_d értékekben is megfigyeltünk változásokat (K_d értékek: anandamid önmagában $30 \pm 6 \mu\text{M}$, $n=7$, PMA-val $9 \pm 4 \mu\text{M}$, $n=5$, $p=0,027$, CY-A-val $11 \pm 5 \mu\text{M}$, $n=5$, $p=0,047$, PMA-val és CY-A-val $11 \pm 3 \mu\text{M}$, $n=3$, $p=0,117$). Végül, a zsírsav-amid hidroláz inhibitor PMSF (0,5 mM) hatását is megvizsgáltuk. PMSF jelenlétében a TRPV1 mérsékelten szenzitizálódott anandamidra ($81,0 \pm 4,8 \%$ hatékonyság és a $K_d = 10,5 \pm 2,8 \mu\text{M}$, $n=4$).

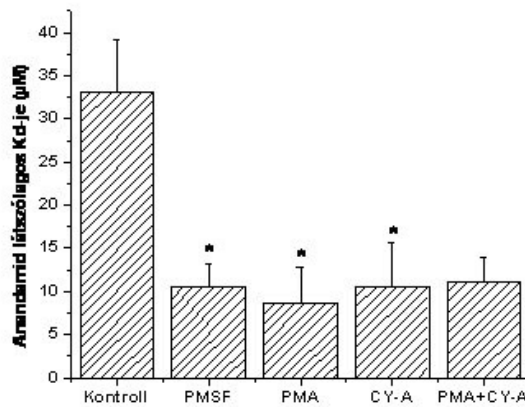
A



B



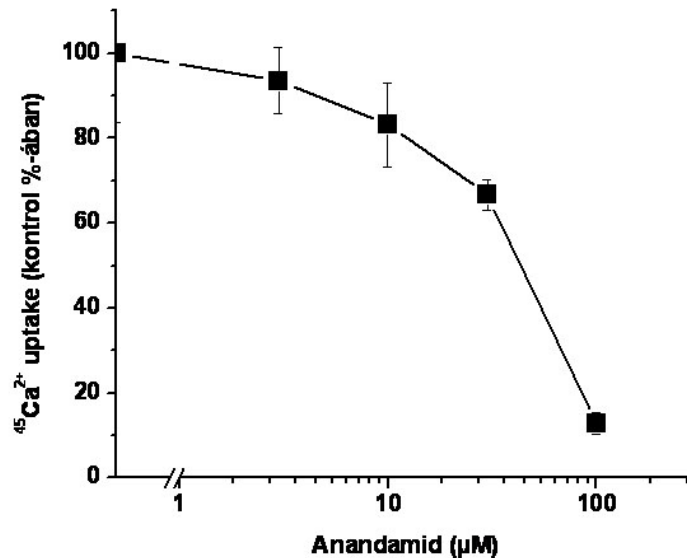
C



11. ábra Az anandamid válaszok jellemzése CHO-TRPV1 sejteken

A sejteket 15 percig előinkubáltuk PMSF-fel (500 nM), PMA-val (100 nM), cyclosporin-A-val (CY-A, 100 nM), valamint PMA és CY-A kombinációjával (mindkettőből 100 nM). A kapott anandamid dózis-hatás görbékből (A panel) meghatároztuk az anandamid hatékonyságát (B panel) és az anandamid látszólagos stabilitási állandóját (C panel).

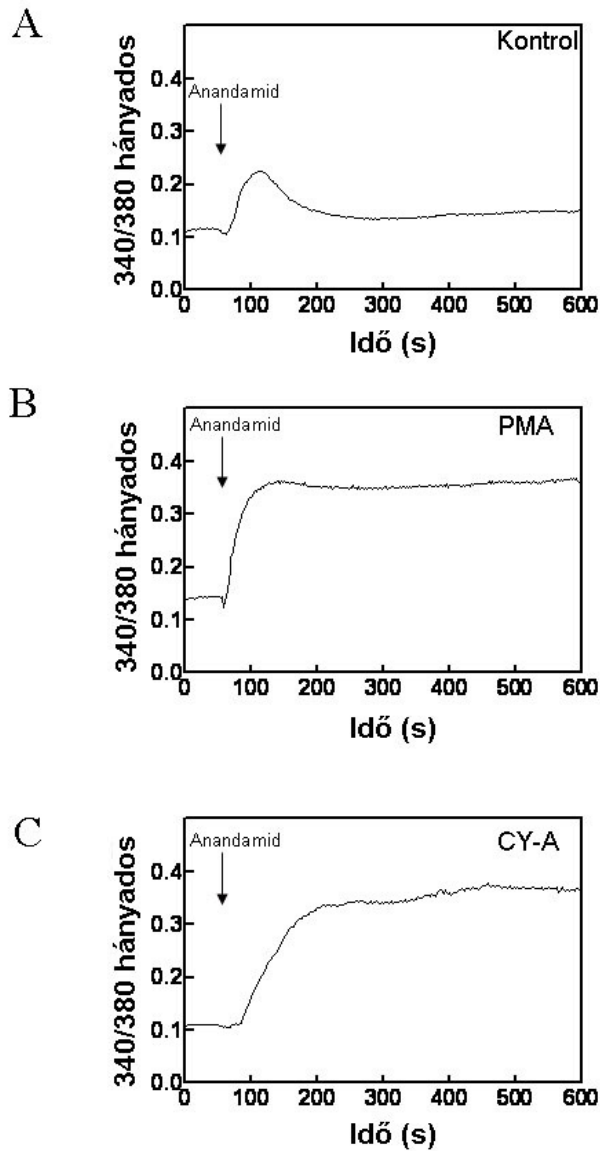
Az anandamid-mediált TRPV1 deszenzitizáció specifikus vizsgálatára kannabinoid receptorokat nem expresszáló CHO-TRPV1 sejteket használtunk. A sejteket anandamiddal előinkubáltuk (1-100 μM 37°C-on 15 percig), majd a $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -felvételt 50 nM kapszaicinnal –ami a kapszaicin félmaximális dózisa ebben a rendszerben – váltottuk ki. Az anandamid dózis függő módon gátolta a $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -felvételt (12. ábra), a látszólagos IC_{50} érték $21 \pm 2 \mu\text{M}$ (n=3) volt. Ez az IC_{50} hasonló a korábbi méréseinkben megállapított K_d -hez (11. ábra, $K_d=30 \pm 6 \mu\text{M}$, n=7).



12. ábra Az anandamid TRPV1 deszenzitizáló hatása CHO-TRPV1 sejteken
CHO-TRPV1 sejteket inkubáltunk anandamiddal 15 percig, majd a TRPV1 deszenzitizációt az 50 nM kapszaicinre adott válasz (kontroll: 50 nM kapszaicinre adott válasz anandamid alkalmazása nélkül) csökkenésével jellemeztük

Ezt követően az anandamid TRPV1 receptorra kifejtett celluláris hatását az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció szintjén is karakterizáltuk a CHO-TRPV1 sejtekben. Az anandamid önmagában (30 μM) az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció átmeneti emelkedését idézte elő (13. ábra), de ez kisebb mértékű volt, mint a kapszaicin által

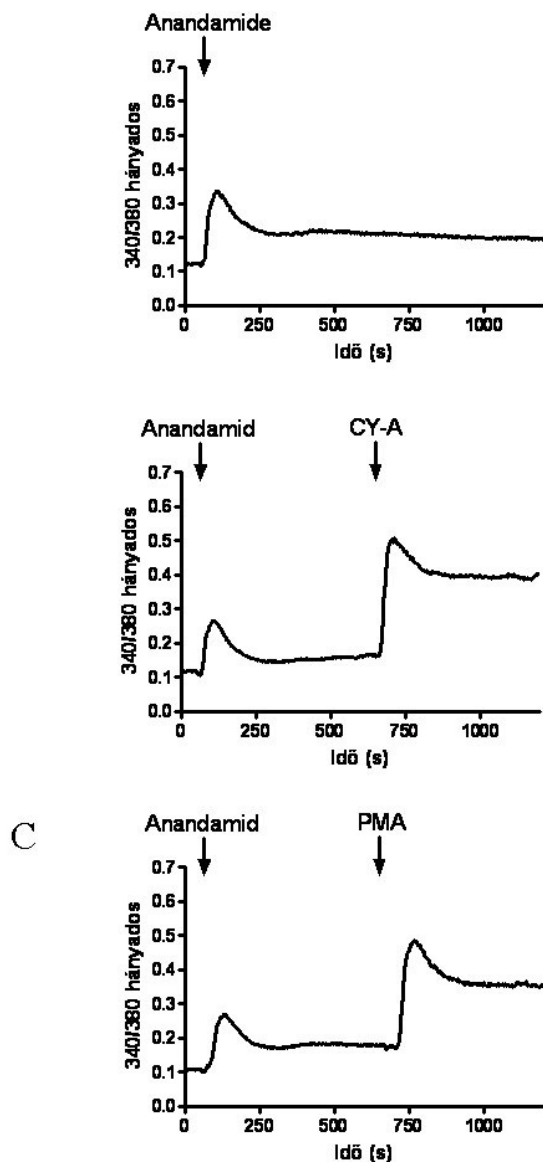
kiváltott válasz. Amikor a sejteket PMA-val előinkubáltuk (100 nM 15 percig, 13. ábra), azok szenzitizálódtak az anandamidra (30 μ M), és a deszenzitizáció nem volt szembetűnő (n=3). Hasonló eredményeket kaptunk a CY-A-val (100 nM, 13. ábra).



13. ábra A CHO-TRPV1 sejtek foszforiláció függő szenzitizációja anandamidra

CHO-TRPV1 sejteket előinkubáltunk pufferrel (kontroll, A panel), 100 nM PMA-val (PMA, B panel) vagy 100 nM cyclosporin-A-val (CY-A, C panel) 15 percig. Ezt követően elkezdtük a 340/380 nm-en gerjesztett FURA-2 fluoreszcencia rögzítését, majd 60 s-nél 30 μ M anandamidot adtunk a sejtekhez. A mérést 600 s-ig folytattuk. Az ábrán egy reprezentatív kísérlet eredménye látható, kezelésként 31-49 sejt választát átlagolva.

A TRPV1 szenzitizációja mellett a reszenzitizációt is vizsgáltuk a CHO-TRPV1 sejteken, az izolált patkány ereknél használt kísérleti protokollhoz hasonló módon (14. ábra). Mind a PMA, mind a CY-A képes volt reszenzitizálni a TRPV1-t, amit az anandamid előzőleg deszenzitizált (n=3).



14. ábra A CHO-TRPV1 sejtek foszforiláció függő reszenzitizációja anandamidra
 A CHO-TRPV1 sejteket 30 μ M anandamiddal (60 s-től) kezeltük, majd 15 perc elteltével puffert (kontroll, A panel), PMA-t (100 nM, B panel) vagy CY-A-t (100 nM, C panel) adtunk hozzájuk, az anandamid folyamatos jelenlétében. A kísérlet során a 340/380 nm-en gerjesztett FURA-2 fluoreszcencia változását 20 percig rögzítettük. Az ábrán egy reprezentatív kísérlet eredménye látható, kezelésenként 31-49 sejt válaszát átlagolva.

MEGBESZÉLÉS

A RAS génpolimorfizmusai és az ISR kialakulása közötti összefüggések

Vizsgálatunkban az in-stent restenosis megjelenése és a RAS különböző genetikai polimorfizmusai közötti lehetséges összefüggéseket tanulmányoztuk. Jelen tudásunk szerint ez az első olyan vizsgálat, melyet az ISR genetikai hátterének kutatására egy magyar populáción végeztek. Egy kardiovaszkuláris mortalitás szempontjából fokozottan érintett populációban alapvető fontosságú a magas rizikójú betegcsoportok minél korábbi és pontosabb azonosítása. A vizsgálat fontos adatokat szolgáltathat annak eldöntéséhez, hogy bizonyos – a RAS-on ható – genotípus-specifikus terápiás próbálkozásoknak lehet-e klinikai jelentősége.

Az irodalomban ellentmondásos eredményeket találhatunk a RAS-hoz kapcsolódó polimorfizmusok és az ISR összefüggéséről, amely tény feltehetően több tényezőnek is köszönhető: szerepet játszhat benne az alacsony elemszám, az eltérő beválogatási kritériumok, vagy az alkalmazott genotípus-analitikai módszer különbözősége (33;34). Ugyanakkor azt is fontolóra kell venni, hogy az egyes vizsgált populációk etnikai háttere is eltérhet (106-109). Így az egyes mutációk és/vagy polimorfizmusok prevalenciáját az egyik populációban nem lehet minden esetben extrapolálni egy másikra. Mi feltételeztük, hogy a RAS polimorfizmusok és az ISR közötti összefüggések különbözhetnek az eltérő etnikai csoportokban, ezért a genetikai asszociációkat egy viszonylag nagylétszámú magyar populációban vizsgáltuk. Összességében eredményeink a negatív genetikai asszociációs tanulmányokban megfogalmazott konklúziókat támogatják.

Az ACE gén I/D polimorfizmusa volt az egyik legkiterjedtebben tanulmányozott polimorfizmus, ennek ellenére az ACE DD genotípusa és az ISR közötti összefüggés

nagyon ellentmondásos maradt. A kezdeti tanulmányok erős kapcsolatot jeleztek az ISR és az ACE D allélja között (35;37). Később nagyobb betegcsoportokon végzett vizsgálatok arra utaltak, hogy az I/D polimorfizmusnak mégis hatása ISR-ra (38;40-43;47;49). Egy nemrégiben publikált metaanalízis demonstrálta, hogy a kombinált OR az ISR kialakulására DD genotípusú egyéneknél 1.22 (95% CI 1.04-1.44) (34), ennek megfelelően a polimorfizmus és a restenosis közötti közvetlen kapcsolat valószínűtlennek tűnik. Egy másik metaanalízis nagyobb epidemiológiai vizsgálatok szükségességére hívta fel a figyelmet, mivel a 200-nál nagyobb elemszámú tanulmányok nem mutattak összefüggést az ACE genotípus és a restenosis között (36). Ebben az esetben is fontos azonban az etnikai különbségek figyelembe vétele: Japánban végzett vizsgálatok során a D allél jelenléte elősegítette az ISR progresszióját (44), és pozitív korrelációt mutatott a stentelt lézióban a lumen felé irányuló remodeling progressziójával (45). A mi eredményeink azt a megfigyelést erősítik meg, miszerint az I/D polimorfizmus nem tudja azonosítani a betegeknek azon csoportját, akiknél nagy valószínűséggel restenosis alakul ki a stent implantációt követően.

Nagyszámú humán vizsgálat készült az AGT gén M235T polimorfizmusa és különböző kardiovaszkuláris kórképek közötti kapcsolat feltárása érdekében is. Völzke és munkatársai, hasonlóan Hertwig munkacsoportjához, kimutatták, hogy a restenosis csoportban szignifikánsan több AGT 235T allél hordozó volt (39;48), ami arra utal, hogy a T allél befolyásolja az ISR kifejlődését, valamint hogy az ismételt angioplasztikát követően kialakuló rekurrens restenosis független prediktora lehet. Ugyanakkor egy japán populációban végzett tanulmány nem talált összefüggést a 235T variáns és a restenosis között (46). Egy 45 267 egyén adatait összesítő metaanalízis szerint az AGT 235T allélja

emelkedett plazma angiotenzinogén szinttel járt, és a TT homozigótáknak 6%-kal nagyobb volt a kockázatuk a hipertónia kialakulására, mint az MM homozigótáknak. Ugyanakkor nem mutatkozott összefüggés az M235T polimorfizmus és az iszkémiás szívbetegség vagy a miokardiális infarktus rizikója között, így a genotípus feltehetően nem befolyásolja az ISR rizikóját, egyik etnikai csoportban sem (51). A mi eredményeinknek sem sikerült demonstrálni kapcsolatot a T allél és a stent implantáció utáni restenosis között.

Sokkal kevesebb adat áll rendelkezésünkre az AT1R A1166C polimorfizmusára vonatkozóan. A mi vizsgálatunk nem erősítette meg egy tényleges kapcsolat fennállását a 1166C allél és az ISR között. Fatini és munkatársai szinergista hatást figyeltek meg az ACE I/D és az AT1R A1166C polimorfizmusa között a miokardiális infarktus rizikójára vonatkozóan, és a két polimorfizmus között egy lehetséges interakciót tételeztek fel (110). Ezzel szemben más vizsgálatok nem tudták alátámasztani ezt az összefüggést (38;46;48), és arra a következtetésre jutottak, hogy az A1166C polimorfizmusnak nincsen befolyása a fentebb említett betegségek hosszútávú kimenetelére (111).

A fentebb említett az ellentmondásos eredmények köszönhetőek egyrészt annak, hogy az eltérő genetikai háttérű populációkra egyetlen mutáció önmagában is eltérő mértékű hatást fejthet ki, másrészt hogy a multifaktoriális betegségek esetében az egyes különálló genetikai rizikófaktorok prediktív értékét nehéz megállapítani (112). Saját vizsgálatainkban ezért a D, T és C allélok egyidejű jelenlétének szinergista hatásának vizsgálatára egy multiplex regressziós analízist végeztünk. Azt találtuk, hogy ezek a genetikai variánsok együttesen sem rizikófaktorai az ISR-nek, sem közvetlenül, sem más rizikófaktorokkal való kölcsönhatásokon keresztül.

Összefoglalva, az általunk tanulmányozott allélok hordozása alapján nem lehet meghatározni a betegek azon csoportját, akik stent implantációt követően a restenosis fokozott rizikóját hordozzák. Eredményeink, más nagy elemszámú vizsgálatokkal összhangban, arra utalnak, hogy a RAS-on ható genotípus-specifikus terápia alkalmazásának létjogosultságára egyelőre nincsen elegendő bizonyíték.

Az új PCR-RFLP módszer jelentősége az M235T polimorfizmus meghatározásában

A napjainkig kifejlesztett antihipertenzív gyógyszerekkel való kezelés általában kielégítő terápiás hatást eredményez, de sajnos nem minden betegben. Ez a tény ösztönözte a hipertónia molekuláris genetikájának megismerésére irányuló kutatások megkezdését.

A legelső gén, amelyről kimutatták, hogy kapcsolatban áll a humán hipertónia kialakulásával, az angiotenzinogén (AGT) génje volt. Jeunemaitre és munkatársai (113) jelentős fejlődést elindító közleményükben arról számoltak be, hogy a fehérje 235. aminosav pozíciójában a metionin treoninra való kicserélődése – az M235T polimorfizmus – kapcsolatban áll az esszenciális hipertónia jelenlétével. Ez a közleményük eddig több, mint 1000 citációt ért el, ami jelzi, mekkora érdeklődés kíséri, ugyanakkor mekkora vita övezi ezt az eredeti megállapítást. Az AGT M235T polimorfizmusnak a betegséggel való összefüggését eddig három nagy meta-analízisben tekintették át (50-52). Ezek és más elemzések megmutatták, hogy valóban, kaukázusiakban és esetleg japánokban, bár gyengén, de az említett polimorfizmus összefüggésbe hozható a hipertónia kialakulásának nagyobb kockázatával, míg afrikaiakban és ázsiaiakban nem. Az adatok bizonyossága azonban ellentmondásos maradt. A mi MEDLINE keresésünk az AGT M235T polimorfizmus és különböző

kardiovaszkuláris betegségek közötti összefüggésekre 3 közleményt eredményezett, melyben kapcsolatot írtak le az M235 alléllal, 12-t, amelyben a T235 alléllal találtak asszociációt, és 23 cikket, mely szerint nem volt ilyen asszociáció. Az ellentmondásos adatok egyik oka lehet a genotípus meghatározásához alkalmazott módszerek bizonytalansága. Kawada és munkatársai (114) rámutattak arra, hogy például japán tanulmányokban, az M235T polimorfizmus meghatározásának különböző módszerei eltérő allélfrekvenciákat eredményeztek.

Mi a munkánk során a PCR-RFLP módszert választottuk, elsősorban azért, mert ez a legtöbb klinikai laboratóriumban könnyen hozzáférhető. A Russ és munkatársai (56) által leírt reakció optimalizációja során – másokhoz hasonlóan (114) – nem tudtunk elérni megbízható genotípus-azonosítást. Törekedtünk mind a PCR, mind a restrikciós emésztés optimális beállítására, mégis bizonytalanságokba ütköztünk. Ezek összességében az M allél gyakoriságának túlbecsléséhez vezettek, mivel nem tudtuk minden kétséget kizáróan elkülöníteni az MT és a TT genotípusokat. A félretipizálás elkerülése érdekében kísérleteinkben kidolgoztunk egy új eljárást, amelyben az eredeti sense primer mellett egy új antisense primert terveztünk, új restrikciós enzim alkalmazását téve lehetővé, és így képesek lettünk az AGT M235T polimorfizmus nagyobb biztonsággal történő kimutatására.

Meg kell említeni, hogy az AGT M235T polimorfizmus meghatározására a direkt szekvenálás és más, elsősorban PCR-technikán alapuló módszerek (53-55) is alkalmasak lehetnek. Ezek a módszerek ugyanakkor speciális felszerelést és speciálisan képzett személyzetet igényelnek, ami a legtöbb kórházban nem elérhető. Ráadásul hátrányaik is vannak. A PCR-ASO esetében például a nukleotidok PCR-termékhez való

hibridizációjának jel-zaj aránya lehet a limitáló körülmény. Az SSCP-nél, a különböző mutációkat tartalmazó DNS szálak elválasztása során, a gél hőmérsékletének nehezen megvalósítható, rendkívül szoros kontrollja bír kiemelkedő jelentőséggel (55). Mindent egybevetve, az általunk leírt PCR-RFLP protokoll egy széles körben elérhető módszerként szolgálhat, az eddigieknél nagyobb pontossággal.

A TRPV1 funkció deszenzitizációja anandamiddal

Vizsgálatunk során arra az eredményre jutottunk, hogy az anandamid önmagában nincs hatással a vázizom arteriolák tónusára, szemben azzal a nagymértékű vazodilatációval, amit mezenterialis erekben, hozzánk hasonlóan, mások is leírtak korábban. Ez az eredmény legalább három különböző mechanizmusból eredhet. Egyrészt a kannabinoid vagy vanilloid receptorok anandamiddal indukált stimulációja alacsony hatékonyságú lehet ahhoz, hogy vázizom arteriolákban vazoaktív választ érzünk el. Másrészt előfordulhat, hogy a kannabinoid és a vanilloid receptorok stimulálása ellentétes hatást vált ki ebben a rendszerben. Harmadszor az is elképzelhető, hogy a preparátumokban nincs jelen aktiválható, funkcionális receptor. Ez utóbbi magyarázatot kizárhatjuk, mivel a kapszaicin markáns vazokonstriktiót okozott, jelezve a funkcionális TRPV1 receptorok jelenlétét preparátumainkban. Sőt, a vázizom arteriolák CY-A-val – protein foszfatáz 2B inhibitor – való előkezelése felfedett egy anandamid-mediált vazokonstriktiót. Ezek az adatok arra utalnak, hogy az anandamid a receptor defoszforiláció-mediált deszenzitizációját indukálja, amely folyamatban feltehetőleg a protein foszfatáz 2B-nek – calcineurinnak – van kulcsfontosságú szerepe.

Az anandamid CHO-TRPV1 sejteken általunk megfigyelt hatékonysága ($65 \pm 8\%$ a kapszaicinhez viszonyítva) és affinitása ($K_d = 30 \pm 6 \mu\text{M}$) a TRPV1 receptorokon

valamivel alacsonyabb a mások által leírtánál. Nevezetesen, Di Marzo és munkatársai (115;115) patkány agyból származó CB1 receptorokon az anandamid affinitását (K_d) 800 ± 200 nM-nak, HEK sejtekben overexpresszált TRPV1 receptorokon 350 ± 91 nM-nak határozták meg. A különbség egyik oka lehet, hogy az anandamid intracelluláris lebontásában kulcsszerepet játszó zsírsavamid-hidrolázok aktivitása eltérő ezekben a rendszerekben. Valóban, Ross és munkatársai a miénkhez nagyon hasonló hatékonyságot írták le az anandamidnak (116), CHO sejtekben expresszált TRPV1-t használva ($10 \mu\text{M}$ anandamidnak $17.8 \pm 3.9\%$ volt a hatékonysága az ő rendszerükben, összehasonlítva a mi $21.6 \pm 2.6\%$ -unkkal). Tovább támogatja ezt az elképzelést, hogy a PMSF alkalmazása érzékenyítette a TRPV1 expresszált sejteket anandamidra, ahogyan azt korábban Ross és munkatársai leírták (116), bár mi az ő méréseikhez képest csak egy mérsékelt szenzitizációt találtunk. Más lehetőségek is hozzájárulhatnak az anandamid affinitásában és hatékonyságában megfigyelt különbségekhez: a TRPV1 expressziós szintjének különbségei, a protein foszforilációjának különbségei (117), az anandamid transzporterek (77), a receptor lokalizációja, és más faktorok is (73;103). Ezek közül néhánynak a szerepét – PKC aktiváció, protein foszfatáz inhibíció – mi is igazoltuk itt bemutatott kísérleteinkben.

Az anandamid szöveti koncentrációja rendszerint 4 és 200 nM között mozog, de primer szenzoros neuron-tenyészetben sokkal nagyobb koncentrációkat is mértek (több, mint $2 \mu\text{M}$ a felülúszóban) (118). Mi a vizsgálatunkban nem kíséreltük meg meghatározni, hogy fiziológiásan az anandamid milyen koncentrációban van jelen. Ehelyett elfogadtuk, hogy az anandamid a TRPV1 egyik élettani regulátora, és rendszerünkben a TRPV1 aktiváláshoz elégséges koncentrációban használtuk az

anandamidot. Mindazonáltal azt is kimutattuk, hogy a CHO-TRPV1 sejtekben az anandamid affinitása nagy valószínűséggel alulbecsült más rendszerekhez képest, a PKC aktiválás, valamint a calcineurin és zsírsavamid-hidroláz gátlás hatásai miatt.

Adataink alapján az anandamid kapszaicinhez viszonyított alacsony hatékonysága a TRPV1 receptorokon kapcsolatos lehet a TRPV1 deszenzitizációjával. Többen leírták már korábban azt a tachyfilaxisként ismert jelenséget, hogy a TRPV1 anandamiddal való aktiválása, a rákövetkező agonistával történő stimulációra deszenzitizációt eredményez (76;82;104;115). Mi azonban, a többi vizsgálóval ellentétben, a tachyfilaxis helyett egy akut deszenzitizációs modellt használtunk, ami a válaszkészség csökkenését jelenti az agonista folyamatos jelenléte mellett. A fiziológiai különbség a két modell között az, hogy a tachyfilaxis esetében az anandamid felszabadulása ismételten történik, míg az akut deszenzitizáció esetében az anandamid folyamatos jelenlétére számítunk. Ez a fajta viselkedés nem korlátozódik csak az anandamidra, mivel más endogén TRPV1 ligandokról, például a NADA-ról (81) és az *N*-oleoyldopamin-ról (119) is leírták, hogy akut deszenzitizációt okoznak, igaz, a foszforiláció szerepére vonatkozó adatok nélkül.

A TRPV1 deszenzitizációjának egyik fontos mechanizmusa a receptor defoszforilációja. Feltételezések szerint a PKC az egyik kináz, amely részt vesz a TRPV1 foszforilációjában (84;117;120), míg foszfatáznak a calcineurint találták (121). Kimutatták, hogy a TRPV1 foszforilációs állapotának változásai vissza tudják fordítani a 100 nM kapszaicin ismételt alkalmazásával előidézett tachyfilaxis típusú deszenzitizációt (120). Tekintettel arra, hogy némely PKC izoenzim és a calcineurin kalcium-dependens enzimek, felvetődik az az érdekes lehetőség, hogy a kinázok és foszfatázok aktuális aktivitása a TRPV1 receptorok aktivációjának szintjétől – az intracelluláris Ca^{2+} -

koncentrációtól – és Ca^{2+} érzékenységtől függ. Arteriolákban a PKC aktivációja TRPV1 független hatásokat eredményezett, ezért ebben a rendszerben csak a calcineurin-inhibitor CY-A-t használatára volt lehetőségünk, amely gátlószer önmagában alkalmazva vazóaktív hatást nem fejtett ki, azonban visszafordította a TRPV1 deszenzitizációját.

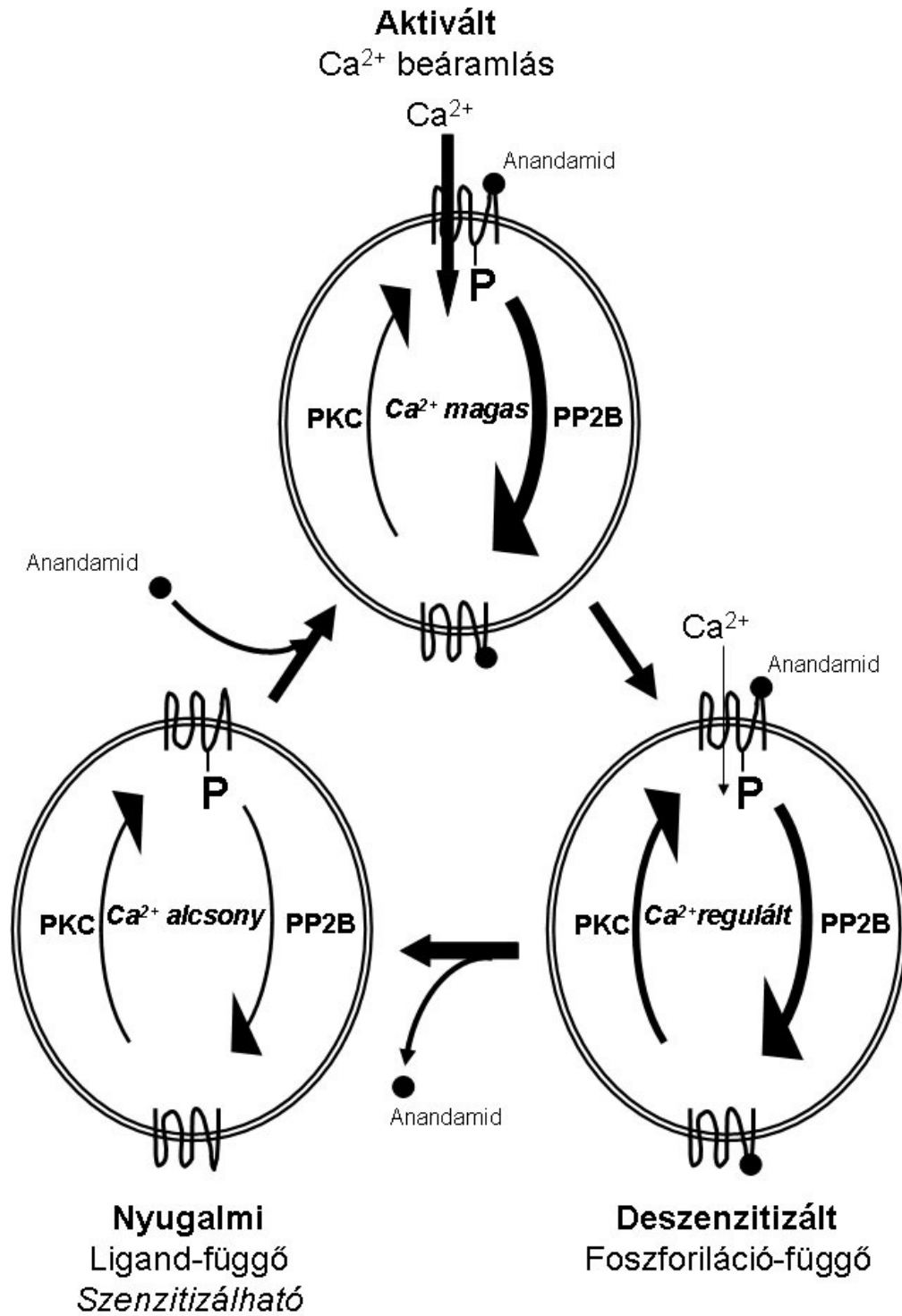
Tovább nyomozva a lehetséges celluláris mechanizmusok után, egy heterológ TRPV1 overexpressziós rendszert (CHO-TRPV1) használtunk. Ennek a rendszernek az az előnye, hogy a TRPV1-mediált hatásokat specifikusan tudjuk megfigyelni, mivel az anandamid receptorok (kannabinoid és vanilloid receptorok) nem expresszálódnak CHO sejtekben. Az anandamid részleges hatékonysága lehetővé tette, hogy vizsgáljuk a foszforilációt, mint az anandamidra való TRPV1 válaszkészség szabályozóját. Adataink azt az elképzelést támogatják, miszerint az anandamid TRPV1 receptorhoz való affinitását és hatékonyságát egyaránt befolyásolja a foszforiláció. A TRPV1 anandamiddal való akut deszenzitizációja elég erőteljes volt ahhoz, hogy jelentősen csökkent mértékű kapszaicin-mediált válaszokat eredményezzen. A PKC aktiválása és a calcineurin gátlása blokkolta, illetve visszafordította az anandamid-mediált deszenzitizációt. Az a megfigyelés, hogy a kontrollhoz és a PMA-kezeléshez viszonyítva a Cy-A kezelés esetében nagyobb mértékű a Ca^{2+} -felvétel, arra utal, hogy a TRPV1-n belül több, fiziológiásan is releváns foszforilációs hely lehetséges, azon kívül, hogy a PKC-helyek érzékenyek a calcineurin-katalizált defoszforilációra.

A mások és saját megfigyeléseinkre alapozva, javaslunk egy mechanizmust az anandamiddal való stimulálás TRPV1 válaszkészségének szabályozására. A modellben három különböző fázist javaslunk: egy nyugalmi, egy aktivált és egy deszenzitizált fázist. A nyugalmi fázisban nincs jelen ligand és a TRPV1 inaktív. A foszforiláció steady-state

szintje határozza meg a TRPV1 érzékenységet az anandamidra. A TRPV1 foszforilációja a jelenlévő foszfatázok – például calcineurin – és kinázok – például PKC – aktivitásának függvénye. Ha a TRPV1 foszforiláltsági állapotát fokozzuk, például PKC aktiválással vagy calcineurin gátlással, a TRPV1 érzékenysége az anandamidra megnő. A második fázis a TRPV1 aktiválása anandamiddal. Az anandamid megjelenésekor a csatorna aktivitása fokozódik, és az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció megemelkedik. Ezt az aktivációt ugyanakkor egy gyors deszenzitizáció követi, ez a harmadik fázis. Ez alatt az akut deszenzitizációs periódus alatt – a ligand folyamatos jelenlétében – a receptor aktivitását és az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációt a reverzibilis foszforiláció szabályozza: a defoszforiláció a TRPV1-t deszenzitizálva, az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációt alacsonyan tartja; míg a foszforiláció szenzitizálja a TRPV1-t és a beáramló Ca^{2+} ionok miatt nő az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció is. Ebben a deszenzitizációs periódusban tehát a TRPV1 egy foszforilációval kapuzott csatornaként viselkedik, mindaddig, amíg az anandamid elégséges koncentrációban van jelen. Amint azonban az anandamid koncentrációja csökken, a csatorna bezáródik, foszforilációs állapotától függetlenül (15. ábra).

Ezeknek a megfigyeléseknek akkor lehet élettani jelentőségük, ha az anandamid vagy anandamid-szerű anyagok, például hasonló tulajdonságú gyógyszer-molekulák, folyamatosan – terápiás koncentrációban – vannak jelen. Ebben az esetben a TRPV1 tevékenységét az akut deszenzitizáció csillapítja, de önmagában a foszforiláció képes azt aktiválni (86). Az ilyen anandamid-szerű anyagok alkalmasak a TRPV1 aktivitás mérséklésére, a teljes agonisták, például a kapszaicin, irritatív hatásai nélkül, ami egy

fejlett terápiás stratégiát jelentene a TRPV1 hiperszenzitivitás által okozott betegségek kezelésében.



15. ábra A TRPV1 foszforiláció függő szabályozása CHO-TRPV1 sejtekben

Az arteriolák esetében, a hatékonyságon kívül, tovább bonyolítja az agonista által kiváltott válaszok értékelését a receptor lokalizációja. Amellett, hogy nem lehet figyelmen kívül hagyni az érfalban futó primer szenzoros neuronokon expresszáldó receptor-populációt, vizsgálatunkban több módszerrel is sikerült igazolni, hogy a vázizom arteriolák falában simaizomsejtek is expresszálják a vanilloid receptort. Ez felveti annak lehetőségét hogy a TRPV1 agonisták a neuronális elemektől függetlenül, közvetlenül a simaizomsejtek vanilloid receptorain keresztül fejtenek ki eltérő hatást a különböző keringési területekről származó erek esetében.

Összefoglalva, az anandamid hatását az érrendszerben valószínűleg mind TRPV1, mind CB1 receptorok mediálják. Lehetséges, hogy az anandamidnak kettős hatása van ezeken a receptorokon: rövid periódusokban szimultán aktiválja mindkét receptort, míg hosszabb időtartamok alatt a TRPV1-t deszenzitizálni tudja, s ezáltal egy metabotrop, foszforiláció-függő receptorrá alakítja. Az esetek többségében mind a TRPV1, mind a CB1 aktivációja vazodilatációhoz vezet, s ez bonyolulttá teszi, hogy az egyes receptorok aktivitásának hozzájárulását vizsgáljuk ehhez a dilatációnak a kialakításához. Ugyanakkor a TRPV1 stimulációja a vázizom arteriolák esetében vazokonstriktációhoz vezet. Ebben a hatásban a simaizomsejteken expresszáldó receptorok is szerepet játszhatnak. Az anandamid hatását vizsgálva ezen erekben, a TRPV1 teljes deszenzitizációját találtuk. Adataink arra utalnak, hogy az anandamid a TRPV1 endogén részleges aktivátora, de legalábbis bizonyos esetekben – ilyenek a vázizom arteriolák – a receptor deszenzitizálója révén a ligand-kapuzott vanilloid receptort foszforiláció-kapuzott csatornává alakítja át.

ÖSSZEFOGLALÁS

Klinikai jellegű vizsgálatainkban a renin-angiotenzin rendszer (RAS) bizonyos genetikai polimorfizmusainak (ACE I/D; AGT M235T; AT1R A1166C) in-stent restenosisban (ISR) játszott szerepét vizsgáltuk, az ISR-re hajlamosító genetikai markerek azonosítása érdekében. A genotípusok meghatározása során az angiotenzinogén M235T polimorfizmus esetében az irodalomban leírt módszerek nem szolgáltattak egyértelmű eredményt. A PCR-RFLP alapú meghatározást ezért sikerrel továbbfejlesztettük (új primerpár tervezésével egy új restriktív enzim felhasználását tettük lehetővé). A genotípusok meghatározását elvégezve azonban (várakozásainkkal ellentétben) nem találtunk összefüggést a vizsgált polimorfizmusok és az ISR között.

Az alapkutatósi téma során az eddig elsősorban szenzoros neuronokban jellemzett vanilloid receptor (TRPV1) stimulációjának hatásait vizsgáltuk izolált, perfundált patkány vázizomból (*m. gracilis*) izolált arteriolákon (érátmérő 80 Hgmm-en 132-223 μm). Eredményeink szerint a receptor stimulációja kapszaicinnel vazokonstriktiót váltott ki, amelyet a TRPV1 specifikus antagonistá capsazepin felfüggesztett. RT-PCR reakcióval és immunhisztokémiai módszerekkel alátámasztottuk, hogy a TRPV1 expresszálódik az erek simaizomsejtjeiben, ami magyarázatul szolgálhat a TRPV1 aktiválás hatására bekövetkező konstriktióra. A TRPV1 endogén agonista anandamid a TRPV1 foszforiláció függő deszenzitizációját váltotta ki vázizoméren és TRPV1-et overexpresszáló CHO sejteken egyaránt, ami arra utal, hogy anandamid a TRPV1 aktiválása helyett annak gátlásában játszhat szerepet. Végül igazoltuk, hogy a TRPV1 anandamid jelenlétében foszforiláció által regulált (metabotróp) receptorként is funkcionálhat.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik nélkülözhetetlen segítséget nyújtottak ahhoz, hogy ez a disszertáció elkészüljön. Hálás köszönetemet fejezem ki mindkét témavezetőmnek: Dr. Mohácsi Attilának, aki megismertette velem a kardiológia szépségeit, és lehetővé tette, hogy elsajátítsam a klinikai kardiológia alapjait; valamint Dr. Tóth Attilának, aki megtanította nekem egy küzdelmes, és „láthatatlan”, de izgalmas laboratóriumi munka, a molekuláris biológia alapjait. Köszönöm mindkettőjüknek a szakmai irányítást, elméleti és gyakorlati tanácsaikat, segítségüket és türelmüket.

Köszönettel tartozom a Klinikai Fiziológiai Tanszék vezetőjének, Dr. Papp Zoltánnak, aki lehetővé tette számomra, hogy megismerjem – és megkedveljem – a laboratóriumban végzett munka hangulatát; hogy megtapasztaljam a közös siker és a közösen végzett munka örömét és néha nehézségeit is; hogy tagja lehettem a tanszék munkacsoportjának.

Köszönöm Dr. Édes István professzor úrnak bátorító támogatását, ösztönzését; hogy lehetővé tette intézetében a kísérleteim megvalósítását, és hogy részt vegyek tudományos konferenciákon, szakmai programokon.

Köszönet illeti a laboratórium analitikusát, Pásztorné Tóth Enikőt kitartó segítségéért, amire mindig lehetett számítani, és azért mert a kritikus pillanatokban mindig megtalálta a megfelelő mentőötletet a továbblépéshez. A tanszék valamennyi dolgozójának köszönöm a munkámhoz nyújtott segítséget.

Nem utolsósorban szeretném kifejezni hálámat a családomnak, szüleimnek és testvéreimnek mindenre kiterjedő támogatásukért és önzetlen segítségükért.

Türelméért, ösztönző támogatásáért és pótolhatatlan szeretetéért hála és köszönet férjemnek.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Inagami T. The renin-angiotensin system. *Essays Biochem* 1994; 28:147-64.:147-164.
2. Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI, Fabiani ME. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci (Lond)* 2001; 100(5):481-492.
3. Erdos EG, Deddish PA, Marcic BM. Potentiation of Bradykinin Actions by ACE Inhibitors. *Trends Endocrinol Metab* 1999; 10(6):223-229.
4. Skegges LT, Jr., Kahn JR, Shumway NP. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J Exp Med* 1956; 103(3):295-299.
5. Hooper NM, Keen J, Pappin DJ, Turner AJ. Pig kidney angiotensin converting enzyme. Purification and characterization of amphipathic and hydrophilic forms of the enzyme establishes C-terminal anchorage to the plasma membrane. *Biochem J* 1987; 247(1):85-93.
6. Oppong SY, Hooper NM. Characterization of a secretase activity which releases angiotensin-converting enzyme from the membrane. *Biochem J* 1993; 292(Pt 2):597-603.
7. Skidgel RA, Erdos EG. Novel activity of human angiotensin I converting enzyme: release of the NH₂- and COOH-terminal tripeptides from the luteinizing hormone-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82(4):1025-1029.
8. Yang HY, Erdos EG, Levin Y. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochim Biophys Acta* 1970; 214(2):374-376.
9. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 2000; 87(5):E1-E9.
10. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2000; 275(43):33238-33243.
11. Katugampola SD, Davenport AP. Radioligand binding reveals chymase as the predominant enzyme for mediating tissue conversion of angiotensin I in the normal human heart. *Clin Sci (Lond)* 2002; 102(1):15-21.
12. Reaux A, Fournie-Zaluski MC, Llorens-Cortes C. Angiotensin III: a central regulator of vasopressin release and blood pressure. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12(4):157-162.
13. Wright JW, Harding JW. Important role for angiotensin III and IV in the brain renin-angiotensin system. *Brain Res Brain Res Rev* 1997; 25(1):96-124.
14. Hamilton TA, Handa RK, Harding JW, Wright JW. A role for the angiotensin IV/AT₄ system in mediating natriuresis in the rat. *Peptides* 2001; 22(6):935-944.
15. Iyer SN, Averill DB, Chappell MC, Yamada K, Allred AJ, Ferrario CM. Contribution of angiotensin-(1-7) to blood pressure regulation in salt-depleted hypertensive rats. *Hypertension* 2000; 36(3):417-422.

16. Kohara K, Brosnihan KB, Chappell MC, Khosla MC, Ferrario CM. Angiotensin-(1-7). A member of circulating angiotensin peptides. *Hypertension* 1991; 17(2):131-138.
17. Roks AJ, van Geel PP, Pinto YM, Buikema H, Henning RH, de Zeeuw D et al. Angiotensin-(1-7) is a modulator of the human renin-angiotensin system. *Hypertension* 1999; 34(2):296-301.
18. Allred AJ, Diz DI, Ferrario CM, Chappell MC. Pathways for angiotensin-(1---7) metabolism in pulmonary and renal tissues. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279(5):F841-F850.
19. AbdAlla S, Lother H, Abdel-tawab AM, Quitterer U. The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem* 2001; 276(43):39721-39726.
20. Dzau VJ. Cell biology and genetics of angiotensin in cardiovascular disease. *J Hypertens Suppl* 1994; 12(4):S3-10.
21. Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, Fery I, Charru A, Clauser E et al. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension* 1994; 24(1):63-69.
22. Jeunemaitre X, Charru A, Chatellier G, Dumont C, Sassano P, Soubrier F et al. M235T variant of the human angiotensinogen gene in unselected hypertensive patients. *J Hypertens Suppl* 1993; 11(5):S80-S81.
23. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86(4):1343-1346.
24. Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). *Nucleic Acids Res* 1992; 20(6):1433.
25. Katsuya T, Koike G, Yee TW, Sharpe N, Jackson R, Norton R et al. Association of angiotensinogen gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease. *Lancet* 1995; 345(8965):1600-1603.
26. Costerousse O, Allegrini J, Lopez M, Alhenc-Gelas F. Angiotensin I-converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. *Biochem J* 1993; 290(Pt 1):33-40.
27. Danser AH, Schalekamp MA, Bax WA, van den Brink AM, Saxena PR, Riegger GA et al. Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism. *Circulation* 1995; 92(6):1387-1388.
28. Miller JA, Thai K, Scholey JW. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism predicts response to losartan and angiotensin II. *Kidney Int* 1999; 56(6):2173-2180.
29. Pende A, Giacche M, Castigliola L, Contini L, Passerone G, Patrone M et al. Characterization of the binding of the RNA-binding protein AUF1 to the human AT(1) receptor mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 266(2):609-614.
30. Smith SC, Jr., Feldman TE, Hirshfeld JW, Jr., Jacobs AK, Kern MJ, King SB, III et al. ACC/AHA/SCAI 2005 guideline update for percutaneous coronary intervention: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/SCAI Writing Committee to Update 2001 Guidelines for Percutaneous Coronary Intervention). *Circulation* 2006; 113(7):e166-e286.

31. Hoffmann R, Mintz GS, Dussaillant GR, Popma JJ, Pichard AD, Satler LF et al. Patterns and mechanisms of in-stent restenosis. A serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 1996; 94(6):1247-1254.
32. Mintz GS, Popma JJ, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Wong C et al. Arterial remodeling after coronary angioplasty: a serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 1996; 94(1):35-43.
33. Monraats PS, Agema RP, Jukema JW. Genetic predictive factors in restenosis. *Pathol Biol (Paris)* 2004; 52(4):186-195.
34. Agema WR, Jukema JW, Zwinderman AH, van der Wall EE. A meta-analysis of the angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and restenosis after percutaneous transluminal coronary revascularization: evidence for publication bias. *Am Heart J* 2002; 144(5):760-768.
35. Amant C, Bauters C, Bodart JC, Lablanche JM, Grollier G, Danchin N et al. D allele of the angiotensin I-converting enzyme is a major risk factor for restenosis after coronary stenting. *Circulation* 1997; 96(1):56-60.
36. Bonnici F, Keavney B, Collins R, Danesh J. Angiotensin converting enzyme insertion or deletion polymorphism and coronary restenosis: meta-analysis of 16 studies. *BMJ* 2002; 325(7363):517-520.
37. Haberbosch W, Bohle RM, Franke FE, Danilov S, Alhenc-Gelas F, Braun-Dullaeus R et al. The expression of angiotensin-I converting enzyme in human atherosclerotic plaques is not related to the deletion/insertion polymorphism but to the risk of restenosis after coronary interventions. *Atherosclerosis* 1997; 130(1-2):203-213.
38. Hamon M, Amant C, Bauters C, Richard F, Helbecque N, Passard F et al. Dual determination of angiotensin-converting enzyme and angiotensin-II type 1 receptor genotypes as predictors of restenosis after coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 1998; 81(1):79-81.
39. Hertwig S, Volzke H, Robinson DM, Motz W, Rettig R. Angiotensinogen M235T gene polymorphism and recurrent restenosis after repeated percutaneous transluminal coronary angiography. *Clin Sci (Lond)* 2002; 103(1):101-106.
40. Jorgensen E, Kelbaek H, Helqvist S, Jensen GV, Saunamaki K, Kastrup J et al. Predictors of coronary in-stent restenosis: importance of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38(5):1434-1439.
41. Koch W, Kastrati A, Mehilli J, Bottiger C, von Beckerath N, Schomig A. Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is not associated with restenosis after coronary stent placement. *Circulation* 2000; 102(2):197-202.
42. Ribichini F, Steffenino G, Dellavalle A, Matullo G, Colajanni E, Camilla T et al. Plasma activity and insertion/deletion polymorphism of angiotensin I-converting enzyme: a major risk factor and a marker of risk for coronary stent restenosis. *Circulation* 1998; 97(2):147-154.
43. Ribichini F, Ferrero V, Matullo G, Feola M, Vado A, Camilla T et al. Association study of the I/D polymorphism and plasma angiotensin-converting enzyme (ACE) as risk factors for stent restenosis. *Clin Sci (Lond)* 2004; 107(4):381-389.

44. Ryu SK, Cho EY, Park HY, Im EK, Jang YS, Shin GJ et al. Renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) gene polymorphism as a risk factor of coronary in-stent restenosis. *Yonsei Med J* 2002; 43(4):461-472.
45. Taniguchi I, Yamazaki T, Wagatsuma K, Kurusu T, Shimazu Y, Takikawa K et al. The DD genotype of angiotensin converting enzyme polymorphism is a risk factor for coronary artery disease and coronary stent restenosis in Japanese patients. *Jpn Circ J* 2001; 65(10):897-900.
46. Toyofyuku M, Imazu M, Sumii K, Yamamoto H, Hayashi Y, Hiyama K et al. Influence of angiotensinogen M253T gene polymorphism and an angiotensin converting enzyme inhibitor on restenosis after percutaneous coronary intervention. *Atherosclerosis* 2002; 160(2):339-344.
47. Volzke H, Hertwig S, Rettig R. The Insertion/Deletion Polymorphism of the Angiotensin-Converting Enzyme Gene and the Risk for Restenosis After PTCA. *Int J Angiol* 2000; 9(2):82-86.
48. Volzke H, Hertwig S, Rettig R, Motz W. The angiotensinogen gene 235T variant is associated with an increased risk of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Clin Sci (Lond)* 2000; 99(1):19-25.
49. Zee RY, Fernandez-Ortiz A, Macaya C, Pintor E, Lindpaintner K, Fernandez-Cruz A. Ace D/I polymorphism and incidence of post-PTCA restenosis: a prospective, angiography-based evaluation. *Hypertension* 2001; 37(3):851-855.
50. Kunz R, Kreutz R, Beige J, Distler A, Sharma AM. Association between the angiotensinogen 235T-variant and essential hypertension in whites: a systematic review and methodological appraisal. *Hypertension* 1997; 30(6):1331-1337.
51. Sethi AA, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Angiotensinogen gene polymorphism, plasma angiotensinogen, and risk of hypertension and ischemic heart disease: a meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(7):1269-1275.
52. Staessen JA, Kuznetsova T, Wang JG, Emelianov D, Vlietinck R, Fagard R. M235T angiotensinogen gene polymorphism and cardiovascular renal risk. *J Hypertens* 1999; 17(1):9-17.
53. Ward K, Hata A, Jeunemaitre X, Helin C, Nelson L, Namikawa C et al. A molecular variant of angiotensinogen associated with preeclampsia. *Nat Genet* 1993; 4(1):59-61.
54. Rodriguez-Perez JC, Rodriguez-Esparragon FJ, Hernandez-Perera O, Fiuza-Perez MD, Anabitarte-Prieto A, Losada-Cabrera A. Effects of the angiotensinogen gene M235T and A(-6)G variants on blood pressure and other vascular risk factors in a Spanish population. *J Hum Hypertens* 2000; 14(12):789-793.
55. Bettinaglio P, Galbusera A, Caprioli J, Orisio S, Perna A, Arnoldi F et al. Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) as a quick and reliable method to genotype M235T polymorphism of angiotensinogen gene. *Clin Biochem* 2002; 35(5):363-368.
56. Russ AP, Maerz W, Ruzicka V, Stein U, Gross W. Rapid detection of the hypertension-associated Met235-->Thr allele of the human angiotensinogen gene. *Hum Mol Genet* 1993; 2(5):609-610.
57. Cortright DN, Szallasi A. Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. An update. *Eur J Biochem* 2004; 271(10):1814-1819.

58. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997; 389(6653):816-824.
59. Sanchez JF, Krause JE, Cortright DN. The distribution and regulation of vanilloid receptor VR1 and VR1 5' splice variant RNA expression in rat. *Neuroscience* 2001; 107(3):373-381.
60. Toth A, Boczan J, Kedei N, Lizanecz E, Bagi Z, Papp Z et al. Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 2005; 135(1-2):162-168.
61. Birder LA, Kanai AJ, de Groat WC, Kiss S, Nealen ML, Burke NE et al. Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(23):13396-13401.
62. Chen CW, Lee ST, Wu WT, Fu WM, Ho FM, Lin WW. Signal transduction for inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 induction by capsaicin and related analogs in macrophages. *Br J Pharmacol* 2003; 140(6):1077-1087.
63. Southall MD, Li T, Gharibova LS, Pei Y, Nicol GD, Travers JB. Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 304(1):217-222.
64. Kedei N, Szabo T, Lile JD, Treanor JJ, Olah Z, Iadarola MJ et al. Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem* 2001; 276(30):28613-28619.
65. Szolcsanyi J. Anandamide and the question of its functional role for activation of capsaicin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21(6):203-204.
66. Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di M, V et al. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 1999; 400(6743):452-457.
67. Szolcsanyi J. Antidromic vasodilatation and neurogenic inflammation. *Agents Actions* 1988; 23(1-2):4-11.
68. Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J et al. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(11):6155-6160.
69. Scotland RS, Chauhan S, Davis C, De Felipe C, Hunt S, Kabir J et al. Vanilloid receptor TRPV1, sensory C-fibers, and vascular autoregulation: a novel mechanism involved in myogenic constriction. *Circ Res* 2004; 95(10):1027-1034.
70. Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F et al. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(12):8400-8405.
71. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992; 258(5090):1946-1949.
72. Di M, V, De Petrocellis L, Fezza F, Ligresti A, Bisogno T. Anandamide receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002; 66(2-3):377-391.
73. Ross RA. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol* 2003; 140(5):790-801.

74. Andersson DA, Adner M, Hogestatt ED, Zygmunt PM. Mechanisms underlying tissue selectivity of anandamide and other vanilloid receptor agonists. *Mol Pharmacol* 2002; 62(3):705-713.
75. Ralevic V, Kendall DA, Jerman JC, Middlemiss DN, Smart D. Cannabinoid activation of recombinant and endogenous vanilloid receptors. *Eur J Pharmacol* 2001; 424(3):211-219.
76. Smart D, Jerman JC, Gunthorpe MJ, Brough SJ, Ranson J, Cairns W et al. Characterisation using FLIPR of human vanilloid VR1 receptor pharmacology. *Eur J Pharmacol* 2001; 417(1-2):51-58.
77. De Petrocellis L, Bisogno T, Maccarrone M, Davis JB, Finazzi-Agro A, Di M, 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.
78. Di M, V, Blumberg PM, Szallasi A. Endovanilloid signaling in pain. *Curr Opin Neurobiol* 2002; 12(4):372-379.
79. Deutsch DG, Ueda N, Yamamoto S. The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002; 66(2-3):201-210.
80. Kozak KR, Marnett LJ. Oxidative metabolism of endocannabinoids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002; 66(2-3):211-220.
81. Toth A, Kedei N, Wang Y, Blumberg PM. Arachidonyl dopamine as a ligand for the vanilloid receptor VR1 of the rat. *Life Sci* 2003; 73(4):487-498.
82. Tognetto M, Amadesi S, Harrison S, Creminon C, Trevisani M, Carreras M et al. Anandamide excites central terminals of dorsal root ganglion neurons via vanilloid receptor-1 activation. *J Neurosci* 2001; 21(4):1104-1109.
83. Mohapatra DP, Nau C. Desensitization of capsaicin-activated currents in the vanilloid receptor TRPV1 is decreased by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. *J Biol Chem* 2003; 278(50):50080-50090.
84. Bhawe G, Hu HJ, Glauner KS, Zhu W, Wang H, Brasier DJ et al. 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.
85. Jung J, Shin JS, Lee SY, Hwang SW, Koo J, Cho H et al. Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *J Biol Chem* 2004; 279(8):7048-7054.
86. Premkumar LS, Ahern GP. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* 2000; 408(6815):985-990.
87. Cesare P, Dekker LV, Sardini A, Parker PJ, McNaughton PA. Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. *Neuron* 1999; 23(3):617-624.
88. Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H, 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.
89. Olah Z, Karai L, Iadarola MJ. Protein kinase C(alpha) is required for vanilloid receptor 1 activation. Evidence for multiple signaling pathways. *J Biol Chem* 2002; 277(38):35752-35759.

90. Szallasi A. Vanilloid (capsaicin) receptors in health and disease. *Am J Clin Pathol* 2002; 118(1):110-121.
91. Akerman S, Kaube H, 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.
92. Harris D, McCulloch AI, Kendall DA, Randall MD. Characterization of vasorelaxant responses to anandamide in the rat mesenteric arterial bed. *J Physiol* 2002; 539(Pt 3):893-902.
93. O'Sullivan SE, Kendall DA, 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.
94. Porszasz R, Porkolab A, Ferencz A, Pataki T, Szilvassy Z, Szolcsanyi J. Capsaicin-induced nonneural vasoconstriction in canine mesenteric arteries. *Eur J Pharmacol* 2002; 441(3):173-175.
95. Szolcsanyi J, Oroszi G, Nemeth J, Szilvassy Z, Blasig IE, 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.
96. Gardiner SM, March JE, Kemp PA, Bennett T. Complex regional haemodynamic effects of anandamide in conscious rats. *Br J Pharmacol* 2002; 135(8):1889-1896.
97. Shanmugam V, Sell KW, Saha BK. Mistyping ACE heterozygotes. *PCR Methods Appl* 1993; 3(2):120-121.
98. Steeds RP, Wardle A, Smith PD, Martin D, Channer KS, Samani NJ. Analysis of the postulated interaction between the angiotensin II sub-type 1 receptor gene A1166C polymorphism and the insertion/deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene on risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2001; 154(1):123-128.
99. Bagi Z, Erdei N, Toth A, Li W, Hintze TH, Koller A et al. Type 2 diabetic mice have increased arteriolar tone and blood pressure: enhanced release of COX-2-derived constrictor prostaglandins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(8):1610-1616.
100. Schumacher MA, Moff I, Sudanagunta SP, Levine JD. Molecular cloning of an N-terminal splice variant of the capsaicin receptor. Loss of N-terminal domain suggests functional divergence among capsaicin receptor subtypes. *J Biol Chem* 2000; 275(4):2756-2762.
101. Szallasi A, Blumberg PM. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* 1999; 51(2):159-212.
102. Toth A, Blumberg PM, Chen Z, Kozikowski AP. Design of a high-affinity competitive antagonist of the vanilloid receptor selective for the calcium entry-linked receptor population. *Mol Pharmacol* 2004; 65(2):282-291.
103. Di M, V, Bisogno T, De Petrocellis L. Anandamide: some like it hot. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22(7):346-349.
104. Helyes Z, Nemeth J, Than M, Bolcskei K, Pinter E, Szolcsanyi J. Inhibitory effect of anandamide on resiniferatoxin-induced sensory neuropeptide release in vivo and neuropathic hyperalgesia in the rat. *Life Sci* 2003; 73(18):2345-2353.

105. Toth A, Wang Y, Kedei N, Tran R, Pearce LV, Kang SU et al. Different vanilloid agonists cause different patterns of calcium response in CHO cells heterologously expressing rat TRPV1. *Life Sci* 2005; 76(25):2921-2932.
106. Barley J, Blackwood A, Sagnella G, Markandu N, MacGregor G, Carter N. Angiotensinogen Met235-->Thr polymorphism in a London normotensive and hypertensive black and white population. *J Hum Hypertens* 1994; 8(8):639-640.
107. Barley J, Blackwood A, Carter ND, Crews DE, Cruickshank JK, Jeffery S et al. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism: association with ethnic origin. *J Hypertens* 1994; 12(8):955-957.
108. Barley J, Blackwood A, Miller M, Markandu ND, Carter ND, Jeffery S et al. Angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism, blood pressure and the renin-angiotensin system in Caucasian and Afro-Caribbean peoples. *J Hum Hypertens* 1996; 10(1):31-35.
109. Sagnella GA, Rothwell MJ, Onipinla AK, Wicks PD, Cook DG, Cappuccio FP. A population study of ethnic variations in the angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism: relationships with gender, hypertension and impaired glucose metabolism. *J Hypertens* 1999; 17(5):657-664.
110. Fatini C, Abbate R, Pepe G, Battaglini B, Gensini F, Ruggiano G et al. Searching for a better assessment of the individual coronary risk profile. The role of angiotensin-converting enzyme, angiotensin II type 1 receptor and angiotensinogen gene polymorphisms. *Eur Heart J* 2000; 21(8):633-638.
111. Stangl K, Cascorbi I, Stangl V, Laule M, Mrozikiewicz PM, Schwarz M et al. A1166C polymorphism of the angiotensin II type 1 receptor gene and risk of adverse events after coronary catheter interventions. *Am Heart J* 2000; 140(1):170-175.
112. Gardemann A, Nguyen QD, Humme J, Stricker J, Katz N, Tillmanns H et al. Angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphism. Absence of an association with the risk of coronary artery disease and myocardial infarction and of a synergistic effect with angiotensin-converting enzyme gene polymorphism on the risk of these diseases. *Eur Heart J* 1998; 19(11):1657-1665.
113. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 1992; 71(1):169-180.
114. Kawada N, Moriyama T, Imai E, Hori M. Angiotensinogen gene polymorphism of threonine/methionine at position 235-potential problems of the modified restriction endonuclease (Tth111-I) digestion method. *J Nephrol* 1997; 10(6):314-317.
115. Di M, V, Lastres-Becker I, Bisogno T, De Petrocellis L, Milone A, Davis JB et al. Hypolocomotor effects in rats of capsaicin and two long chain capsaicin homologues. *Eur J Pharmacol* 2001; 420(2-3):123-131.
116. Ross RA, Gibson TM, Brockie HC, Leslie M, Pashmi G, Craib SJ et al. 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.
117. Vellani V, Mapplebeck S, Moriondo A, Davis JB, McNaughton PA. Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J Physiol* 2001; 534(Pt 3):813-825.

118. Ahluwalia J, Yaqoob M, Urban L, Bevan S, Nagy I. Activation of capsaicin-sensitive primary sensory neurones induces anandamide production and release. *J Neurochem* 2003; 84(3):585-591.
119. Szolcsanyi J, Sandor Z, Petho G, Varga A, Bolcskei K, Almasi R et al. Direct evidence for activation and desensitization of the capsaicin receptor by N-oleoyldopamine on TRPV1-transfected cell, line in gene deleted mice and in the rat. *Neurosci Lett* 2004; 361(1-3):155-158.
120. Mandadi S, Numazaki M, Tominaga M, Bhat MB, Armati PJ, Roufogalis BD. Activation of protein kinase C reverses capsaicin-induced calcium-dependent desensitization of TRPV1 ion channels. *Cell Calcium* 2004; 35(5):471-478.
121. Docherty RJ, Yeats JC, Bevan S, 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.

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

1. **Lizanecz E.**, Bagi Z., Pásztor E.T., Papp Z., Édes I., Kedei N., Blumberg P.M., Tóth A. (2006): Phosphorylation-dependent desensitization by anandamide of vanilloid receptor-1 function in rat skeletal muscle arterioles and in Chinese hamster ovary cells expressing TRPV1 *Mol Pharmacol* **69**(3), 1015-1023. IF: 5,080
2. **Lizanecz E.**, Pásztor E.T., Mohácsi A., Papp Z., Édes I., Tóth A. (2006): Mistyping of angiotensinogen M235T alleles *Hypertens Res* **29**, 197-201. IF: 1,731

Közlésre benyújtva:

Lizanecz E., Tóth A., Pásztor E.T., Papp Z., Czuriga I., Édes I., Mohácsi A. (2006): Gene polymorphisms of the renin-angiotensin system and the coronary in-stent restenosis

Előkészületben:

Bagi Z., **Lizanecz E.**, Pásztor E.T., Erdei N., Papp Z., Édes I., Blumberg P.M., Tóth A. (2006): Transient potential receptor type V1 (vanilloid receptor, TRPV1) expressed in vascular smooth muscle cells and mediates arteriolar constriction.

Idézhető absztraktok:

1. **Lizanecz E.**, Tóth A., Papp Z., Tóth E., Édes I., Mohácsi A. (2004): Renin-angiotensin system gene polymorphisms and their associations with coronary in-stent restenosis *Cardiol Hung* **34**,C64.
2. **Lizanecz E.**, Erdei N., Bagi Zs., Édes I., Tóth A. (2005): Role of TRPV1 in vascular tone regulation *Cardiol Hung* **35**, A24.
3. **Lizanecz E.**, Bagi Z., Papp Z., Édes I., Kedei N., Blumberg P.M., Tóth A. (2005): Anandamide as an antagonist of the vanilloid receptor-1 (TRPV1) in rat skeletal muscle arterioles. *J Muscle Res Cell Motil* **26**, 69.
4. **Lizanecz E.**, Bagi Z., Papp Z., Édes I., Kedei N., Blumberg P.M., Tóth A. (2005): Anandamide as an antagonist of the vanilloid receptor-1 (TRPV1) located in the rat skeletal muscle arterioles. *Acta Physiol Hung* in press
5. **Lizanecz E.**, Bagi Z., Pásztor E.T., Papp Z., Édes I., Kedei N., Blumberg P.M., Tóth A. (2006): Desensitization of the vanilloid receptor-1 (TRPV1) by anandamide *Cardiol Hung* **36**, A23.

Egyéb, az értekezéshez fel nem használt közlemények:

1. Tóth A., Boczán J., Kedei N., **Lizanecz E.**, Bagi Z., Papp Z., Édes I., Csiba L., Blumberg P.M. (2005): Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain *Brain Res Mol Brain Res* **135**(1-2) 162-168. IF: 1,711
2. Mohácsi A., **Lizanecz E.** (2002) Endothelial dysfunction and possibilities for treatment in patients with chronic heart failure *Lege Artis Medicinae* **12**(8), 467-473. IF: 0
3. Mohácsi A., **Lizanecz E.**, Édes I., Czuriga I. (2004): Role of tissue angiotensin converting enzyme in cardiovascular diseases *Lege Artis Medicinae* **14**(12), 843-849. IF: 0

Egyéb, az értekezéshez fel nem használt idézhető absztraktok:

1. Mohácsi A., **Lizanecz E.** (2001): Long-term ACE-inhibition reverses endothelial dysfunction in the presence of D-allele in patients with dilated cardiomyopathy *Cardiol Hung Suppl* **2**, 78.
2. **Lizanecz E.**, Mohácsi A. (2001): Relationship between angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and endothelial function in normal humans *Cardiol Hung Suppl* **2**, 97.
3. Mohácsi A., **Lizanecz E.** (2001): Long-term ACE-inhibition reverses endothelial dysfunction in the presence of D-allele in patients with dilated cardiomyopathy *J Am Coll Cardiol* **39**(9), 401B (Suppl B)
4. Lenkey Á., **Lizanecz E.**, Mohácsi A. (2002): Natriuretic peptides in patients with hypertension. *Clinical and Experimental Laboratory Medicine* **29** (1)
5. **Lizanecz E.**, Lenkey Á., Mohácsi A. (2003): Diagnostic value of circulating natriuretic peptides in patients with hypertension. *Cardiol Hung Suppl* **2**, 90.

Magyar nyelvű könyvfejezet:

Lizanecz E., Mohácsi A. II.3.a) Molekuláris biológiai alapfolyamatok – Inflammáció
In: *Atherosclerosis*, Szerk.: Császár Albert. Synergo Kiadó és Marketing Kft. 2004, Budapest. pp.115-118.