

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**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

1. BEVEZETÉS

1.1. 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 perifériás ellenállásra, az artériás vérnyomásra, a folyadékfelvételre, valamint az elektrolit forgalomra egyaránt kiterjednek. 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 angiotenzinogénből (AGT) egy decapeptidet, az angiotenzin I-et, (Ang I) hasít le. Az Ang I-et az angiotenzin konvertáz enzim (ACE) további két aminosav lehasításával angiotenzin II (Ang II) oktapeptiddé alakítja, ami a szervezet egyik leghatékonyabb vazopresszor molekulája. Az Ang II G-fehérjékhez kapcsolt 1-es és a 2-es típusú Ang II receptorokon (AT1R és AT2R) fejti ki hatásait. Az akut vazokonstriktió mellett az Ang II hosszútávon hatással van a sejtosztódást 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.

A RAS-ban különböző negatív visszacsatolási útvonalak játszhatnak szerepet az egyes peptidek keletkezési és lebomlási sebességének szabályozásában. A szabályozás felborulásakor a rendszer számos eleme közül a legkártékonyabb eredménnyel az Ang II felszaporodása jár, hiszen az általa kiváltott vazokonstriktió, sejt-hipertrófia és hiperplázia olyan betegségek kialakulásának kezdeti lépéseit jelentik, mint a hipertónia, az atherosclerosis, következményes koszorúsérbetegséggel, szívinfarktussal, szívelégtelenséggel. Így a RAS komponensei közül az Ang II keletkezésében kulcsszerepet játszó, illetve hatását közvetítő AGT, ACE és az AT1R a mai napig a legtöbbet vizsgált molekulák. Humán génjeik klónozása számos genetikai polimorfizmus – legalább 1 % gyakorisággal előforduló génváltozat – felfedezéséhez vezetett,

melyek közül több is gyanúba keveredett, mint a fenti kórképek esetleges rizikófaktora.

Az AGT M235T polimorfizmusa a 235. aminosav pozícióban egy treonin megjelenését jelenti, a vad típusban található metionin helyett. A T235 allélt hordozó egyénekben emelkedett plazma AGT koncentrációt találtak. Az ACE-gént egy Inzerció/Deléción (I/D) polimorfizmussal szokták jellemezni. II-homozigótákkal összehasonlítva, az ACE szérumszintje DD-homozigótákban a magasabb, míg ID-heterozigótákban egy intermedier értéken helyezkedik el. Az AT1R génjének A1166C polimorfizmusa az 1166. nukleotid pozícióban egy adenin citozinra cserélődését jelenti. Vizsgálatok szerint a C allél emelkedett kardiovaszkuláris kockázattal járhat.

Magyarországon a koszorúsérbetegség és az iszkémiás szívbetegség vezető halálteki tényezők, ezért fontos azon egyének azonosítása, akik a kardiovaszkuláris morbiditás és mortalitás szempontjából fokozottan veszélyeztetettek. A betegség kezelésében mára rutineljárássá vált a beszűkült koszorúserek ballonos tágítása és egy fémháló, úgynevezett stent beültetése (percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA). Az esetek 20-30 %-ában azonban újabb szűkület, restenosis alakul ki a korábbi tágítás területén. Mint ahogyan maga a koronária-betegség, az in-stent restenosis (ISR) is egy multifaktoriális betegség, kialakulásában az Ang II-höz kapcsolódó simaizomsejt-túlnövekedés, neointima-proliferáció meghatározó szerepét feltételezik.

Az elmúlt másfél évtizedben számos vizsgálat született az ISR kialakulása és a RAS genetikai polimorfizmusai közötti kapcsolat felderítésére. Az egyes etnikai csoportok genetikai háttere azonban különböző lehet. Így például bizonyítást nyert, hogy egy genetikai polimorfizmus japán lakosság körében feltárt prevalenciáját nem extrapolálhatjuk a kaukázusi páciensekre. Hasonlóképpen a különböző populációk esetében leírt asszociációkat a magyar lakosság körében is ellenőrizni kell.

1.2. Az AGT M235T polimorfizmusának meghatározása

Az AGT gén M235T polimorfizmusának kardiológiai betegségekkel történő asszociációjának meghatározása során, a különböző vizsgált populációkban meglehetősen ellentmondásos eredmények születtek. A bizonytalanságot tovább növelheti, hogy az egyes tanulmányok során eltérő laboratóriumi módszereket alkalmaztak. Az AGT M235T genotípusok meghatározására legalább négy különböző metódust használtak eddig, úgymint (i) polimeráz láncreakciót (PCR) követő allél-specifikus oligonukleotid hibridizációt (PCR-ASO), (ii) olyan PCR reakciót (MS-PCR), amelyben három primer felhasználásával az összes lehetséges allélt felszaporították, (iii) egyszálú DNS konformáció polimorfizmus (SSCP) analízist és (iv) PCR-restrikciós fragment méret polimorfizmust (PCR-RFLP). Laboratóriumunkban ez utóbbi, PCR-RFLP módszer beállítása során technikai nehézségekbe ütköztünk. Célunk (az AGT M235T polimorfizmus in-stent restenosisban játszott szerepének feltárása) elérése érdekében ezért szükségessé vált a PCR-RFLP módszer továbbfejlesztése a megbízhatóbb genotipizálás elérése érdekében.

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

A vanilloid receptor (TRPV1) egy nem-specifikus kation csatorna, viszonylag nagy szelektivitással a kalciumra. A receptort olyan fájdalmat okozó fizikai és kémiai hatások aktiválják, mint a magas hő, az alacsony pH, extracelluláris ozmolaritás- és nyomásváltozások, a paprika csípősségéért felelős kapszaicin és tágabb értelemben az úgynevezett vanilloidok. A TRPV1-et elsősorban a fájdalmat közvetítő nociceptorok, a primer szenzoros neuronok expresszálják, emellett azonban különböző központi idegrendszeri régiókban, a cortexben, a hippocampusban, a corpus callosumban, sőt az itt futó erek astrocytáiban és pericytáiban is sikerült igazolni jelenlétét. 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.

A TRPV1 aktiválódása a szenzoros neuronok axonterminálisaiban az intracelluláris nátrium- és kalcium ion koncentrációjának emelkedéséhez vezet. A nátrium ionok beáramlása a nociceptorok depolarizációja révén központi idegrendszeri stimulációhoz, végeredményben fájdalomérzethez vezet. Az intracelluláris kalcium ion koncentráció emelkedése ugyanakkor különböző neurotranszmitterek, például calcitonin-gén rokon peptid (CGRP) és a substance P lokális felszabadulását eredményezi, melyek a továbbiakban újabb mediátorokat szabadítanak fel, így a szenzoros funkció mellett a vanilloid receptorok egy effektor mechanizmusnak is résztvevői.

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-hidroperoxy-eikozatetraénsav (HPETE), 15-HPETE, 20-hidroxy-eikozatetraénsav (HETE)), az *N*-arachidonoyl-dopamin (NADA) és az *N*-arachidonoyl-ethanolamid, másnéven anandamid. Ez utóbbi ligand, melyet eredetileg a kannabinoid receptor-1 (CB1) aktivátoraként ismerték meg, állt vizsgálataink központjában. Míg a különböző kísérleti rendszerekben az anandamid hasonló affinitással aktiválta a CB1 és a TRPV1 receptorokat, hatékonyságát tekintve jelentős különbségeket találtak: egyes kísérleti rendszerekben teljes, másokban parciális agonistának bizonyult. Az anandamid kapcsán figyelembe kell venni, hogy hatékonyságát nagymértékben meghatározza metabolizmusa. Sejtbe való bejutásáért egy membrán-transzporter felelős. Majd a már intracelluláris anandamidot zsírsavamid-hidrolázok, valamint különböző oxigenázok gyorsan átalakítják.

Korábban kimutatták, hogy a TRPV1 parciális aktivációja más endogén ligandok számára részleges gátló hatást idézhet elő. Ilyen ligand lehet a NADA vagy más, még nem azonosított endogén ethanolamidok. Azt is feltételezik,

hogy a TRPV1 anandamiddal való aktiválása a receptor deszenzitizációját okozza az újbóli agonista stimulációra (tachyfilaxis). A TRPV1-en ható ligandok hatékonyságát nagymértékben befolyásolhatja a receptor foszforilációs állapota. A TRPV1-et a protein kináz A (PKA), a protein kináz C (PKC) és a Ca^{2+} /calmodulin dependens kináz II (CaMKII) is képes foszforilálni. A TRPV1 PKA és PKC általi foszforilációja érzékenyíti a receptort a különböző vanilloidokra, az anandamidra, a hő és protonok általi stimulációra.

A vanilloid receptor szerepét számos szerv fiziológias működésében vizsgálták, és nagyon sokféle betegség kialakulásával, patofiziológiájával összefüggésbe hozták. A mi 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 vanilloid receptorok aktiválásán keresztül mind az anandamid, mind a kapszaicin vazodilatációt okoz mezenteriális, hepaticus, baziláris és meningeális erekben. Mindezek mellett azt is leírták, hogy a TRPV1 stimulálása patkány és kutya mezenteriális illetve koszorúerekben vazokonstriktációt képes okozni. Sőt arra is van adat, hogy az *in vivo* anandamid kezelés átmeneti vazokonstriktációt okozott éber patkányokban vese, mezenteriális és végtagi erekben. Ezekben a munkákban mechanizmusként az axonterminálisokból felszabaduló neurotranszmitterek szerepét feltételezték. Saját kísérleteinkben a vanilloid receptorok funkcionális szerepét vizsgáltuk a vázizom arteriolákban, melyek lényeges szerepet töltenek be a keringés szabályozásában, a véreloszlás meghatározásában. Vizsgálataink célja a TRPV1 funkcionális szerepének meghatározása, a receptort expresszáló sejtek azonosítása és a receptor anandamiddal történő stimulációjának tanulmányozása volt patkány m. gracilis-ből izolált perfundált arteriolákban. A vanilloid receptor mediált celluláris hatások specifikus értékelése érdekében egy TRPV1 overexpresszáló sejt vonalat (CHO-TRPV1) használtunk. Végül, jellemeztük a receptor foszforiláltsági állapotának szerepét is.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során az alábbi célkitűzések kísérletes megvalósítását hajtottuk végre:

1. Az ACE I/D, AT1R A1166C és az AGT M235T polimorfizmusok meghatározása
2. 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
3. Funkcionális vanilloid receptorok kimutatása vázizom arteriolákban
4. A TRPV1-et expresszáló sejttípusok azonosítása
5. A receptor anandamiddal történő stimulációjának tanulmányozása
6. A receptorműködés celluláris hatásainak specifikus vizsgálata TRPV1 overexpresszáló sejtvonal segítségével
7. A foszforiláció szerepének vizsgálata a receptor anandamid válaszkészségének szabályozásában

3. MÓDSZEREK

3.1. Az in-stent restenosis vizsgálatában részt vevő betegek

A vizsgálatban 239 beteg vett részt (valamennyien kaukázusiak, északkelet magyarországi lakosok), akiknél a perkután koronária intervenció, stent-implantáció, majd ezt követően visszatérő panaszok és/vagy pozitív terheléses vizsgálatok miatt kontroll-angiográfia történt. Az in-stent restenosis, a közvetlenül az intervenciót követően készült felvételhez viszonyítva, 50 %-nál nagyobb 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. A stentelést követő gyógyszeres terápia minden beteg esetében tartalmazott aspirint (100 mg naponta) és clopidogrelt (75 mg naponta). ACE-gátló beépítése a terápia a kezelőorvos döntésén alapult. A vizsgálatot a „World Medical Association”

Helsinki Deklarációjával (2000) összhangban és az Intézeti Etikai Bizottság jóváhagyásával végeztük. Valamennyi beteg tájékozott beleegyezését adta a diagnosztikus és terápiás eljárásokhoz.

3.2. Genetikai analízis

A genomi DNS-t perifériás vér fehérvérsejtjeiből izoláltuk, FlexiGene DNA Kit segítségével (Qiagen, Hilden, Germany). Az ACE-gén I/D polimorfizmusát PCR-módszerrel Rigat és munkatársai protokollját követve (Rigat B és munkatársai, Nucleic Acids Res 1992; 20(6):1433.), az inzerciót is magába foglaló DNS-szekvencia amplifikálásával határoztuk meg.

Az AGT-gén M235T polimorfizmusának meghatározásához először egy korábban leírt PCR-RFLP-n alapuló eljárást használtuk (Hum. Mol. Genet. 1993; 2(5):609-610.). Későbbi kísérleteinkben ez utóbbi 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.

Az AT1R-gén A1166C polimorfizmusát szintén PCR-RFLP technikával, egy korábban leírt módszer alapján határoztuk meg (Steeds RP és munkatársai, Atherosclerosis 2001; 154(1):123-128.).

3.3. A klinikai adatok 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 jellemzőket százalékos gyakoriságban vagy abszolút számokban fejeztük ki. Az egyes csoportok között χ^2 teszttel (nominális adatok) vagy Student's *t*-teszttel (folyamatos változók) végeztünk összehasonlításokat. 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) program segítségével végeztük.

3.4. A vázizom arteriolák izolálása és az érátmérő mérése

Altatott Wistar patkányokból a m. gracilisban intramusculárisan futó arteriolát izoláltuk, majd 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). Az ér mindkét végét kanüláltuk, az intraluminális nyomást 80 Hgmm-re állítottuk, míg a hőmérsékletet 37°C-on tartottuk. A belső érátmérőt az arteriola-szegmens közepén video-mikroszkópia segítségével mértük. 60-120 perc regenerációs periódus során az erek spontán miogén tónusa kifejlődött. Az endothelium épségét valamennyi kísérlet előtt acetilkolinnal, simaizomfunkciót norepinefrin alkalmazásával ellenőriztük. A kapszaicin és anandamid válaszkészség meghatározásakor kumulatív dózis-hatás vizsgálatokat alkalmaztunk. Az ereket TRPV1 ligandok mellett a protein foszfatáz-2B gátlószer cyclosporin-A-val is kezeltük. Az állatkísérleteket a National Institute of Health ajánlása szerint, a DE OEC szabályzatának megfelelően végeztük.

3.5. A TRPV1 kimutatása immunhisztokémiával és immunfluoreszcenciával

Vázizom (m. gracilis) szövetmintákból 10 µm vastagságú cryostat metszeteket készítettünk, melyeket adhezív tárgylemezen 10 percig acetonban fixáltunk, majd kecske normál-szérum (1,5 %, Sigma) tartalmú PBS-ben blokkoltunk. Elsődleges antitestként nyúlban termeltetett anti-vanilloid receptor antitestet (Calbiochem) használtunk, 1:100 hígításban. Ezután a metszeteket 1:200 hígítású, biotinilált anti-nyúl antitesttel (Vector Laboratories) inkubáltuk, majd az immunkomplexeket Vector VIP szubsztráttal (Vector Laboratories) tettük láthatóvá. Végül a metszeteket metil-zölddel (sejtmag festék) is megfestettük.

A fluoreszcens mikroszkópia esetében hasonlóan jártunk el, az alábbi különbségekkel: második antitestként 1:100 hígítású, FITC-konjugált kecske anti-nyúl antitestet (Vector Laboratories) használtunk. A simaizom-réteg megjelenítésére 1:50 hígítású, monoklonális egér simaizom-aktin ellenes antitestet (Novocastra), majd 1:100 hígítású, Texas Red-konjugált kecske anti-egér antitestet (Jackson Immunoresearch Laboratories) alkalmaztunk. Végül a metszeteket, Vectashield (Vector Laboratories) fedőmédiával fedtük le.

3.6. A TRPV1 expressziójának igazolása RT-PCR segítségével

Patkány aortából, valamint tenyésztett A7r5 simaizom sejtekből RNeasy RNS izoláló kit (Qiagen) segítségével mRNS-t izoláltunk. Majd ebből a templátból RevertAid H Minus kit (Fermentas) alkalmazásával teljes hosszúságú cDNS-t szintetizáltunk, melyben vizsgáltuk a TRPV1-et kódoló szekvencia előfordulását. A TRPV1 sense primer szekvenciája: 5' – CTA CCT GGA ACA CCA ATG TGG G – 3' volt, míg az antisense szekvencia: 5' – GCT GGG TGG CAT GTC TAT CTC G – 3' volt (Sigma). Konstitutívan expresszálódó génnek a GAPDH-t 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 269 bp méretű termék keletkezett. 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.

3.7. A CHO-TRPV1 sejtek tenyésztése

A szelektált, stabil, TRPV1 expresszáló CHO sejtklónban (Tet-Off indukált CHO-TRPV1 sejtek) a TRPV1 expressziót a tetracyclin megvonásával indukáltuk.

3.8. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -uptake kísérletek

A kísérletekhez a CHO-TRPV1 sejteket 24-lyukú plate-en 20-40 %-os konfluencia eléréséig tenyészettük, majd a médiumot tetracyclin nélküli (indukáló) médiumra cseréltük. A kísérleteket körülbelül 48 órával az indukció után végeztük. A CHO-TRPV1 sejteket közvetlenül a CO_2 inkubátorból való kivétel (a foszforiláció hatását vizsgáló kísérletekben 15 perces 100 nM-os cyclosporin-A és/vagy 100 nM-os PMA kezelés után) 5 percig 37°C -on inkubáltuk 500 μl szérum-mentes, 0,25 mg/ml BSA (Sigma) tartalmú DMEM-ben (Life Technologies, tartalmaz 1,8 mM CaCl_2 -ot), melyhez 1 $\mu\text{Ci/ml}$ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -ot (ICN) adtunk. A maximális választ ugyanazon a plate-en 300 nM capsaicin által kiváltott válaszként határoztuk meg. Közvetlenül az inkubálás után, az extracelluláris $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -t etávolítottuk, a sejtek 1,8 mM CaCl_2 -t tartalmazó hideg DPBS-ben való háromszori mosásával. Az internalizálódott $^{45}\text{Ca}^{2+}$ mennyiségének mérése érdekében a sejteket lizáltuk, majd a sejt-lizátum radioaktivitását szcintillációs számlálóval mértük. Az adatokat a Hill-egyenlet komputeres illesztésével elemeztük.

3.9. Intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció mérések

A mérésekhez a CHO-TRPV1 sejteket 25 mm-es kerek üveg fedőlemezekre helyeztük a fenntartó médiumban. Másnap a médiumot indukáló médiumra cseréltük. Körülbelül 24 órával az indukció után a 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). A méréseket Ca^{2+} tartalmú (1,8 mM) DPBS-ben végeztük. Az individuális sejtek fluoreszcenciáját InCyt Im2 fluoreszcencia imaging rendszerrel mértük (Intracellular Imaging). 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 elemeztük és Excel (Microsoft) valamint GraphPad Prism 2.0 (GraphPad Software) programokkal dolgoztuk fel.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az ACE I/D, AT1R A1166C és az AGT M235T polimorfizmusok meghatározása

A renin-angiotenzin rendszer genetikai polimorfizmusainak meghatározása kapcsán sikerrel alkalmaztuk az irodalomban talált módszereket az ACE I/D és az AT1R A1166C polimorfizmusok meghatározására, míg AGT-gén M235T polimorfizmusának meghatározása során problémákat tapasztaltunk. A Russ és munkatársai által leírt módon végezve a genotipizálást 123 páciens között nem találtunk TT genotípusút, annak ellenére, hogy az M allél frekvenciája 0,634-nek, a T allélé 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). Ez a tény a korábban leírt allélfrekvenciákat figyelembe véve, vagy a PCR-amplifikációban, vagy a restrikciós emésztésben rejlő technikai problémákat sugallt.

Hogy kiküszöböljük a félretipizáláshoz vezető lehetséges problémákat, először egy magasabb hibridizációs hőmérsékletet használtunk – 64°C –, ezáltal növelve a PCR-reakció specifikusságát. Ekkor hatékonyabb restrikciós emésztést tapasztaltunk, de a kapott PCR termékek T allélre specifikus teljes hasítódását nem tudtuk elérni. Hasonlóan sikertelennek bizonyult a Tth 111 I restrikciós enzim helyett az ugyanazon szekvenciát hasító Psy 1 használata.

Az egyik beteg DNS mintáját felhasználva, különböző emésztési időtartamok és enzimkoncentrációk mellett vizsgáltuk a hasítás kinetikáját és hatékonyságát. Habár a hosszabb időtartammal és magasabb enzimaktivitással párhuzamosan a hasítás egyre nagyobb arányú volt, a teljes emésztődést továbbra sem tudtuk elérni.

Az AGT M235T polimorfizmus pontosabb meghatározása érdekében ezért kidolgoztunk egy módosított PCR-RFLP protokollt. Sajnálatos módon az eredeti eljárás kidolgozása óta sem vált hozzáférhetővé olyan restrikciós enzim,

amely az M235T polimorfizmus kialakításáért felelős nukleotid szekvenciában képes lenne hasítani. Így egy új primert terveztünk, amelyben egyetlen mismatch alkalmazásával (szemben az eredeti protokoll két nukleotid cseréjével) kialakítottunk egy Box I restrikciós helyet. A PCR reakció új primerrel történő optimalizálását követően a Box I emésztés teljes hasítást okozott. Az így meghatározott genotípusok pontos azonosítása érdekében a fenti kísérletekben felhasznált PCR termékeket szekvenálással is ellenőriztük. A szekvenálás megerősítette a PCR-RFLP analízisben kapott genotípusokat.

A 123 páciens DNS-mintáját újrazsgálva az eredeti protokollal szemben 33 MM, 56 MT és 34 TT genotípust találtunk. Az új módszerrel gyűjtött adatok statisztikai analízise alapján az M allél frekvenciája 0.4959-nek, a T allél pedig 0.5040-nek adódott. Ezek az allélfrekvenciák egy Hardy-Weinberg egyensúlyban lévő populációt reprezentálnak (Chi-négyzet próbával meghatározva $p > 0.5$, nincs szignifikáns eltérés a várt értékektől).

4.2. Az ACE I/D, az AGT M235T és az AT1R A1166C polimorfizmus és az in-stent restenosis megjelenése közötti összefüggések vizsgálata percután koronária intervención átesett betegek körében

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. Össességében 330 szűkületbe 347 stent beültetése történt. Angiológiai in-stent restenosis (ISR) 116 páciensben 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, az érátmérő vagy előtágítás alkalmazása, között sem.

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. 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 ($p=0,65$).

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 bármilyen összefüggést egy bizonyos genotípus és a kontroll angiográfián látott lumenátmérő csökkenés foka között. Ezzel szemben a hagyományosan ismert rizikófaktorok közül a korábban elszenvedett miokardiális infarktusról igazolódott, hogy hatással van a lumen beszűkülésére.

Hogy a génpolimorfizmusok szinergista hatását tisztázzuk, kiválasztottuk azokat a betegeket, akik az itt vizsgált genetikai polimorfizmusok közül valamennyi, kardiavaszkuláris 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.

4.3. Funkcionális vanilloid receptorok kimutatása vázizom arteriolákban

A kísérletek során patkány vázizom (m. gracilis) rezisztencia ereken (érátmérő 80 Hgmm-en 132-223 μm) végeztük méréseinket, perfúziós miográf-

rendszerben. A kezelések előtt minden alkalommal meggyőződünk az arteriolák spontán miogén tónusáról (átlagos miogén konstrikción: 25 ± 4 %; érátmérő: Ca^{2+} jelenlétében: 179 ± 33 μm és Ca^{2+} hiányában: 234 ± 20 μm , $n=15$, $p<0,01$), az endothelium épségét acetil-kolinnal (10^{-7} M, 95 ± 13 % dilatáció, $n=15$), míg a simaizom-funkciót norepinefrinnel ellenőriztük (10^{-7} M, 31 ± 14 % konstrikción, $n=15$).

Az ép endothel és simaizom funkcióval rendelkező ereken először a TRPV1 stimuláció hatását vizsgáltuk. A kapszaicin (1 μM) 58 ± 8 % konstrikción okozott ($n=5$), amit a kompetitív TRPV1 antagonistá capsazepin felfüggesztett (10 μM , 2 ± 5 % konstrikción, $n=5$, $p<0,01$). Ismert, hogy a TRPV1 gyakran deszenzitizálódik tartós agonista kezelés hatására, így vizsgáltuk az ismételt kapszaicin stimuláció hatását: 20 perces folyamatos kapszaicin kezelés (1 μM , maximális konstrikción: 51 ± 12 %) nem deszenzitizálta szignifikánsan a TRPV1-et (maximális konstrikción 40 perccel később: 35 ± 7 %, ($n=5$), $p=0,29$).

4.4. A TRPV1-et expresszáló sejtípusok azonosítása

Immunhisztokémiai módszerekkel intenzív TRPV1-szerű festődést találtunk vázizom erekből. Tekintettel arra, hogy a kapott festődés leginkább a simaizom sejtekre jellemzőnek bizonyult, kísérletet tettünk a simaizomsejtek TRPV1 expressziójának specifikus vizsgálatára. A TRPV1 simaizom expresszióját RT-PCR segítségével vizsgálva kimutattuk a receptor mRNS-ének jelenlétét aortából és tenyésztett vaszkuláris simaizomsejtekből (A7r5 sejtek).

Annak igazolására, hogy a vázizom arteliolában is expresszálják simaizomsejtek a TRPV1-et, immunfluoreszcens festéseket végeztünk. A m. gracilisból származó arteriolában a simaizom eredetű aktin és a TRPV1 festődése jelentős átfedést mutatott, ami alátámasztotta a TRPV1 simaizomsejtekben történő expresszióját.

4.5. A receptor anandamiddal történő stimulációjának tanulmányozása

A TRPV1 specifikus agonista kapszaicin vazokonstriktív hatása szöges ellentétben állt a mezenteriális erekben korábban megfigyelt vazodilatációs válasszal. Annak ellenőrzésére, hogy az általunk kapott fiziológiai hatás nem műtermék, mezenteriális ereket is vizsgáltunk, amelyekben mind a receptor exogén (kapszaicin), mind endogén ligandját (anandamid) teszteltük. 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 $23,6 \pm 3,3$ %, $n=5$, $p<0,01$).

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

Ennek egyik lehetséges oka a TRPV1 deszenzitizációja lehetett, ezért rendszerünkben vizsgáltuk 30 μ M anandamid (20 percig alkalmazva, majd, 40 perc regeneráció) hatását a TRPV1 válaszkészségre. 1 μ M kapszaicin az erek szignifikáns konstriktív hatását okozta (konstriktív hatás 51 ± 12 %, $n=5$, $p=0,018$), amely vazokonstriktív hatás az anandamid kezelés után nem volt megfigyelhető (kapszaicin kiváltott konstriktív hatás $1 \pm 0,6$ %, $n=5$). Az anandamid TRPV1-re gyakorolt gátló hatását a cyclosporin A (CY-A, protein foszfatáz 2B inhibitor, 100 nM, 5 perc) visszafordította (konstriktív hatás kapszaicinre 31 ± 1 %, $n=4$, $p=0,014$ a konstriktív hatásra, nincs szignifikáns különbség az önmagában alkalmazott kapszaicin választól, $p=0,12$). Sőt, az anandamid kismértékű, de szignifikáns konstriktív hatást okozott hasonló CY-A kezelést (100 nM, 5 perc) követően (maximális konstriktív hatás 7 ± 2 %, $n=4$, $p=0,01$).

4.6. A receptorműködés celluláris hatásainak specifikus vizsgálata TRPV1 overexpresszáló sejt vonal segítségével

A TRPV1 vázizom arteriolákon tapasztalt deszenzitizációjához vezető mechanizmusok feltárására egy exogén, TRPV1 expresszáló sejt vonalat használtunk. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -uptake mérések arra utaltak, hogy az anandamid parciális agonistaként viselkedik ebben a rendszerben (maximális hatás a 300 nM capsaicin által indukált hatás $65 \pm 8 \%$ -a, $n=7$). Ezt a parciális agonizmust a PKC aktiválása 4 α -forbol-mirisztát-acetáttal (PMA) (100 nM, hatékonyság: $98 \pm 14 \%$, $n=3$, $p=0,059$), vagy a protein foszfatáz 2B (calcineurin) gátlása CY-A-val (100 nM, hatékonyság: $145 \pm 14 \%$, $n=5$, $p<0,001$), vagy mindkét ágens együttes alkalmazása (hatékonyság: $137 \pm 13 \%$, $n=3$, $p=0,001$) 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 zsírsavamid hidroláz-inhibitor fenil-metán-szulfonil-fluorid (PMSF) (0,5 mM) hatását is megvizsgáltuk. PMSF jelenlétében a TRPV1 mérsékleten szenzitizálódott anandamiddra ($81,0 \pm 4,8 \%$ hatékonyság és a $K_d = 10,5 \pm 2,8 \mu\text{M}$, $n=4$).

Hogy az anandamid-mediált deszenzitizációt specifikusan vizsgáljuk a TRPV1 receptorokon, a CHO-TRPV1 sejteket, amelyek nem expresszálják a kannabinoid receptort, 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, 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, $K_d=30 \pm 6 \mu\text{M}$, $n=7$).

4.7. A foszforiláció szerepének vizsgálata a TRPV1 anandamid válaszkészségének szabályozásában

Az anandamid TRPV1 receptorra kifejtett celluláris hatását az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció szintjén is vizsgáltuk CHO-TRPV1 sejtekben. Az anandamid önmagában (30 μM) az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció átmeneti emelkedését idézte elő, de ez kisebb mértékű volt, mint amit a kapszaicin váltott ki. A PMA-val, vagy CY-A-val (100 nM mindkettőből, 15 percig) előinkubált sejtek szenzitizálódtak az anandamidra (30 μM), és az anandamid alkalmazása során (15 perc) deszenzitizáció sem volt szembetűnő (n=3).

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

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. A RAS génpolimorfizmusai és az in-stent restenosis (ISR) kialakulása közötti összefüggések

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 génvariáns, amelyről kimutatták, hogy kapcsolatban áll a humán hipertónia kialakulásával, az AGT M235T polimorfizmus volt. Az eredeti közlemény eddig több, mint 1000 citációt ért el, ami jelzi, mekkora érdeklődés kíséri, ugyanakkor mekkora vita övezi ezt az eredeti megállapítást.

Az ellentmondásos adatok egyik oka lehet a genotípus meghatározásához alkalmazott módszerek bizonytalansága, mely tényre korábbi tanulmányokban már történt utalás. Saját kísérleteinkben a Russ és munkatársai által leírt módszer beállítása során (másokhoz hasonlóan) nem tudtunk elérni megbízható

genotípus-azonosítást, annak ellenére, hogy nagy gondot fordítottunk mind a PCR, mind a restrikciós emésztés optimalizációjára. Összességében eredményeink az M allél gyakoriságának túlbecsléséhez vezettek, mivel nem tudtuk minden kétséget kizáróan elkülöníteni az MT és a TT genotípusokat. A félretipizálás elkerülése érdekében módosítottuk az eredeti eljárást, amennyiben az eredeti sense primer mellett egy új antisense primert terveztünk, amely egy új restrikciós enzim alkalmazását téve lehetővé. A módosítások eredményeképpen képesek lettünk az AGT M235T polimorfizmus meghatározására és a módosított protokoll az eddigieknél nagyobb pontosságú genotipizálást tehet lehetővé.

A RAS-hoz kapcsolódó polimorfizmusok és az ISR összefüggéséről az irodalomban ellentmondásos eredményeket találhatunk. Az ACE gén I/D polimorfizmusa esetében a kezdeti tanulmányok erős kapcsolatot jeleztek az ISR és az ACE D allélja között. Később nagyobb betegcsoportokon végzett metaanalízisek demonstrálták, hogy a kombinált odds ratio (OR) az ISR kialakulására DD genotípusú egyéneknél 1.22 (95 % CI 1.04-1.44), ennek megfelelően a polimorfizmus és a restenosis közötti közvetlen kapcsolat elég valószínűtlennek tűnik, amellett, hogy általában a 200-nál nagyobb elemszámú tanulmányok nem mutatnak összefüggést az ACE genotípus és a restenosis között. Tovább árnyalja a képet az etnikai különbségek ténye: a Japán populáción végzett vizsgálatokban a D allél jelenléte elősegítette az ISR progresszióját, és pozitív korrelációt mutatott a stentelt lézióban a lumen felé irányuló remodeling progressziójával. Saját eredményeink szerint az ACE I/D polimorfizmus nem mutat összefüggést az ISR-rel.

Az AGT gén M235T polimorfizmusa és különböző kardiovaszkuláris kórképek közötti kapcsolat feltárása során kimutatták, hogy a restenosis csoportban szignifikánsan több AGT 235T allél hordozó volt, ami arra utal, hogy a T allél befolyásolja az ISR kifejlődését, valamint hogy az ismételt angioplasztikát követően kialakuló restenosis független prediktora lehet. Ugyanakkor japán tanulmányokban nem találtak összefüggést a 235T variáns és

a restenosis között. Metaanalízisek szerint az AGT 235T allélja emelkedett plazma angiotenzinogén szinttel jár és a TT homozigótáknak 6 %-kal nagyobb a kockázatuk hypertónia kialakulására, mint az MM homozigótáknak. Ugyanakkor nem mutatkozik összefüggés az M235T polimorfizmus és az ISR között, amit saját vizsgálatunkban sem sikerült demonstrálni.

Vizsgálataink az AT1R A1166C polimorfizmusára vonatkozóan sem támasztották alá a 1166C allél és az ISR közötti kapcsolat létét.

A multifaktoriális betegségek esetében az egyes különálló genetikai rizikófaktorok prediktív értékét nehéz megállapítani. Saját vizsgálatainkban ezért a D, T és C allélok egyidejű jelenlétének szinergista hatásának vizsgálatára is végeztünk egy multiplex regressziós analízist. Eredményeink szerint az általunk meghatározott 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.

5.2. A vanilloid receptor fiziológiai szerepének tanulmányozása

Vizsgálatainkban a TRPV1 endogén ligand anandamid önmagában nem volt hatással a vázizom arteriolák átmérőjére, szemben azzal a vazodilatációval, amit mezenteriális erekben, hozzánk hasonlóan, mások is leírtak korábban. Ennek legalább három különböző oka lehet: egyrészt a kannabinoid vagy vanilloid receptorok anandamiddal indukált stimulációja túl alacsony hatékonyságú lehet ahhoz, hogy vázizom arteriolákban vazoaktív választ érjünk 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, TRPV1 receptor. Ez utóbbi magyarázatot kizárhatjuk, mivel a kapszaicin markáns vazokonstriktiót okozott, jelezve a funkcionális TRPV1 receptorok jelenlétét

preparátumainkban. Sőt, a vázizom arteriolák cyclosporin-A-val (CY-A, protein foszfatáz 2B inhibitor) történő 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 (calcineurin) kulcsfontosságú szerepe van.

Mivel némely TRPV1 aktivitást befolyásoló kináz (PKC izoenzimek, CaM kináz II) és a calcineurin kalcium-dependens enzimek, lehetséges, hogy a kinázok és foszfatázok aktuális aktivitása az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációtól és a TRPV1 receptorok Ca^{2+} érzékenységétől függ.

A celluláris mechanizmusok feltárására egy heterológ TRPV1 expressziós rendszert (CHO-TRPV1) használtunk, melyben a TRPV1-mediált hatásokat specifikusan tudtuk megfigyelni, mivel kannabinoid és vanilloid receptorok nem expresszálódnak CHO sejtekben. Az anandamid CHO-TRPV1 sejteken általunk megfigyelt hatékonysága ($65 \pm 8 \%$ a kapszaicinhez viszonyítva) és affinitása ($K_d = 30 \pm 6 \mu M$) a TRPV1 receptorokon valamivel alacsonyabb a mások által leírtnál. A különbség egyik oka lehet, hogy az anandamid intracelluláris lebontásában kulcsszerepet játszó zsírsavamid-hidrolázok aktivitása eltérő ezekben a rendszerekben. Magyarázatként szolgálhatnak még a TRPV1 expressziós szintjének különbségei, a protein foszforilációjának különbségei, az anandamid transzporterek, a receptor lokalizációja, és más faktorok is. Ezek közül néhányak szerepét (PKC aktiváció, protein foszfatáz inhibíció) mi is igazoltuk itt bemutatott kísérleteinkben.

Az anandamid TRPV1-en kiváltott részleges hatékonysága miatt vizsgáltuk a foszforilációt, mint az anandamidra való TRPV1 válaszkészség lehetséges szabályozóját. Adataink azt az elképzelést támogatják, miszerint a foszforiláció nem csak az anandamid TRPV1 receptorhoz való affinitását, hanem hatékonyságát is befolyásolja. A TRPV1 anandamiddal kiváltott akut deszenzitizációja elég erőteljes volt ahhoz, hogy jelentősen csökkent mértékű

kapszaicin-mediált válaszokat eredményezzen. A PKC aktiválása és a calcineurin gátlása gátolta, sőt visszafordította az anandamid-mediált deszenzitizációt.

A mások és saját megfigyeléseinkre alapozva, javasolunk egy mechanizmust a TRPV1 anandamid válaszkészségének szabályozására. Ebben a modellben három különböző fázist feltételezünk: 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 érzékenységét az anandamidra. A TRPV1 foszforilációja a jelenlévő foszfatázok és kinázok 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, 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.

Ezeknek a megfigyeléseknek akkor lehet élettani jelentőségük, ha az anandamid vagy anandamid-szerű anyagok, például hasonló tulajdonságú gyógyszermolekulák, folyamatosan – terápiás koncentrációban – jelen vannak. Ebben az esetben a TRPV1 tevékenységét az akut deszenzitizáció csillapítja, de önmagában a foszforiláció képes azt aktiválni. Az ilyen anandamid-szerű

anyagok alkalmasak a TRPV1 aktivitás mérséklésére, a teljes agonisták (például kapszaicin) irritatív hatásai nélkül, ami egy fejlett terápiás stratégiát jelentene a TRPV1 hiperszenzitivitás által okozott betegségek kezelésében.

6. 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. Célunk annak eldöntése volt, hogy ezek a polimorfizmusok használhatóak-e az ISR prediktív markereiként. A genotípusok meghatározása során szembesültünk azzal a problémával, hogy az angiotenzinogén M235T polimorfizmus esetében az irodalomban leírt módszerek nem szolgáltatottak egyértelmű eredményt. A PCR-RFLP alapú meghatározást ezért sikerrel továbbfejlesztettük (új primerpár tervezésével egy új restrikciós enzim felhasználását tettük lehetővé). A genotípusok meghatározását elvégezve azonban (várakozásainkkal ellentétben) nem találtunk összefüggést a vizsgált polimorfizmusok és az ISR között.

Az alapkutatói jellegű vizsgálataink során az eddig elsősorban szenzoros neuronokban jellemzett, nonspecifikus Ca^{2+} csatorna, a vanilloid receptor (TRPV1) stimulációjának hatásait vizsgáltuk izolált, perfundált patkány vázizomból (m. gracilis) izolált arteriolákon (érátmérő 80 Hgmm-en 132-223 μ m). Eredményeink szerint a receptor stimulációja a TRPV1 specifikus agonista kapszaicinnal vazokonstriktiót váltott ki, amelyet a TRPV1 specifikus antagonistá capsazepin felfüggesztett. RT-PCR reakcióval és immunhisztokémiai módszerekkel alátámasztottuk, hogy a TRPV1 expresszálódik az általunk vizsgált erek simaizomsejtjeiben is, ami magyarázatul szolgálhat a TRPV1 aktiválás hatására bekövetkező konstriktióra. Ezt követően a TRPV1 endogén agonista anandamid hatását vizsgáltuk. Eredményeink szerint az anandamid a TRPV1 foszforiláció függő deszenzitizációját váltja ki vázizoméren és TRPV1-et overexpresszáló CHO sejteken egyaránt, ami arra utal, hogy az anandamid bizonyos körülmények között a TRPV1 aktiválása helyett annak gátlásában játszhat szerepet. Végül igazoltuk, hogy a TRPV1 anandamid jelenlétében foszforiláció által regulált (metabotróp) receptorként is funkcionálhat.

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.