

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**TRANZIENS RECEPTOR POTENCIÁL ANKYRIN 1 ÉS VANILLOID 1
IONCSATORNÁK, VALAMINT A HIPOFÍZIS ADENILÁT-CIKLÁZ
AKTIVÁLÓ POLIPEPTID ELŐFORDULÁSA ÉS EXPRESSZIÓS
VÁLTOZÁSAI ENDOMETRIUMBAN ÉS EMLŐBEN**

POHÓCZKY KRISZTINA

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Neurofarmakológiai Program

Doktori iskola vezető, programvezető: Prof. Dr. Pintér Erika

Témavezetők: Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna, Dr. Czeglédi Levente



Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Pécs

2017

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
I. ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	8
1. A kapszaicin kutatások története, a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződés és szerepük gyulladásban, fájdalomban	8
2. A TRP receptorok	10
2.1. A TRPV1 és TRPA1 receptor.....	12
2.2. A TRPV1 és TRPA1 receptorok extraneuronális előfordulása, expressziója az uterusban és endometriózisban	17
3. Szenzoros neuropeptidek és a PACAP.....	19
3.1. A PACAP szerepe a szervezet folyadéktartéiba	23
3.2. A PACAP és az agyi eredetű neurotrofikus faktor (BDNF) kapcsolata	24
4. MIF	25
5. Az endometriózis patomechanizmusa	28
5.1. Az endometriózis osztályozása	30
5.2. Az endometriózis kezelése.....	30
II. CÉLKITŰZÉSEK.....	32
III. KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK	33
1. Mintagyűjtés.....	33
1.1. Patkány minták gyűjtése, alkalmazott kezelések.....	33
1.2. Klinikai minták gyűjtése, vizsgálati csoportok.....	35
1.3. Juh minták gyűjtése, vizsgálati csoportok.....	36
2. Primer uterus sejtenyészet és az alkalmazott <i>in vitro</i> kezelések.....	37
3. mRNS expresszió vizsgálata	40

4. Immunhisztokémia.....	42
5. Intracelluláris kalciumionszint mérés fluoereszcens módszerrel	43
6. PACAP radioimmunoassay (RIA)	44
7. VIP kimutatása enzimmel kötött immunszorbens módszer segítségével (ELISA)	45
8. Statisztikai analízis	46
IV. EREDMÉNYEK	48
1. A TRPA1 és TRPV1 ioncsatornák, valamint a MIF jelenléte és ösztrogén kezelés hatására bekövetkező expresszió-változása patkány endometriumban	48
1.1.1. A TRPA1/V1 és MIF mRNS expresszió fokozódása DES előkezelés hatására.	48
1.2. A TRPA1/V1 és MIF génexpressziójának változása <i>in vitro</i> DES kezelés hatására endometrium sejt kultúrában	50
1.3. A TRPA1/V1 és MIF fehérje lokalizációja és hormonfüggő növekedése patkány endometriumban.....	51
1.3.1. A TRPA1/V1 funkcionális vizsgálata patkány primer uterus sejt kultúrában.	59
1.4. TRPA1/V1 expresszió növekedése primer uterus sejt kultúrájában MIF kezelést követően	61
2. A TRPA1 és TRPV1 receptorok expressziója DIE-ban	62
2.1. A TRPA1/V1 mRNS expresszió-fokozódása DIE lézióban	62
2.2. A TRPA1 és TRPV1 fehérje lokalizációja és emelkedése DIE mintákban	63
2.3. A TRPA1/V1 immunpozitivitás korrelációja DIE-asszociált klinikai paraméterekkel	67
3. A PACAP vizsgálata juh emlő-és tejmintákban, valamint szopós bérányok plazmájában	69
3.1. PACAP38-IR mérése juh plazmában és bérányokban történő emelkedése szopás után.....	69
3.2. A PACAP mRNS-és fehérje expressziójának változásai juh emlőben	71
3.3. A VIP expressziójának vizsgálata juh emlőben, illetve plazma-és tejmintákban.....	72
3.4. A PAC1 receptor és a BDNF génexpressziójának vizsgálata emlőben.....	74

V. MEGBSZÉLÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK.....	75
1. A TRPV1 és TRPA1 ioncsatornák, valamint a MIF jelenléte és ösztrogén kezelés hatására bekövetkező expresszió-változása patkány endometriumban.....	75
2. A TRPA1 és TRPV1 receptorok expressziója humán DIE-ban	77
3. A PACAP vizsgálata juh emlő-és tejmintákban, valamint szopós bárányok plazmájában.....	80
ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS EGYSÉGES ÉRTELMEZÉSE	84
FÜGGELÉK.....	85
IRODALOMJEGYZÉK.....	88
AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK.....	113
EGYÉB EREDETI PUBLIKÁCIÓK.....	114
IDÉZHETŐ ABSZTRAKTOK	115
KONGRESSZUSI SZÓBELI ELŐADÁSOK JEGYZÉKE	117
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	118

Rövidítések jegyzéke

5HT_{2/4}: 5-hidroxi-triptamin receptor 2/4

15d-PGJ2: 15d-PGJ2 [15-deoxy-delta (12,14)-Prostaglanin J(2)]

AA: arachidonic acid/arachidonsav

AC: adenilát-cikláz

ALS: amyotrophic lateral sclerosis/ amiotrófiás laterálszklerózis

AP-1: aktivátor protein-1

ATP: adenzin-trifoszfát

B₂: bradikinin receptor 2

BDNF: brain-derived neurotrophic factor/ agyi eredetű neurotrofikus faktor

BK₁₋₂: bradikinin receptor 1, 2

cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát

CGRP: calcitonin gene-related peptide/ kalcitonin gén-rokon peptid

COX-2: ciklooxygenáz-2

cPLA2: citoszolikus kalcium-dependens foszfolipáz A2

cpm: counts per minute/ percenkénti beütés szám

Ct érték: threshold cycle/ küszöb ciklusszám

CXCR 2/4: CXC kemokin receptor 2/4

DAB: diamino-benzidin

DES: dietil-stilbösztrol

DIE: deep infiltrating endometriosis/ mélyen infiltráló endometriózis

DM: dysmenorrhea

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DRG: dorsal root ganglion/ hátsó gyöki ganglion

EBM: evidence based medicine / (tudományos) bizonyítékokon alapuló orvoslás

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid/ etilén-diamin-tetraecetsavat

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay/ enzimmel kötött immunoszorbens módszer

ER α : estrogen- receptor α / ösztrogén receptor alfa

ER β : estrogen- receptor beta/ ösztrogén receptor béta

ECS: extracellular solution/ extracelluláris oldat

Erk1/2: extracellular signal-regulated kinase/ extracelluláris szignál-regulált kináz

FEPS: familial episodic pain syndrome/ familiáris epizodikus fájdalom szindróma

FOXO3a: Forkhead box O3

fura-2 AM: fura-2 acetoxi metilészter

GI: gasztrointesztinális traktus

GnRH: gonadotropin relasing-hormon

GPCR: G-protein coupled receptor/ G-fehérje kapcsolt receptor

HBSS: Hank's Balanced Salt Solution/ Hank's oldat

HEPES: 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etánszulfonsav

HSH: hypomagnesemia with secondary hypocalcemia/ hipomagnezémia másodlagos hipokalcémiával

IC: intracelluláris

IFN- γ : interferon- γ

IL-1 α : interleukin-1 α

IL-1 β : interleukin-1 β

IL-2: interleukin-2

IL-6: interleukin-6

IL-8: interleukin-8

iNOS: inducible nitric-monoxide synthase/ indukálható nitrogén-monoxid szintáz

IP₃: inozitol-trifoszfát

Jab-1: Jun-aktivációs domén kötő fehérje-1

KIR: központi idegrendszer

MAPK: mitogén aktivált protein-kináz

MIF: makrofág migrációt gátló faktor

MKP1: MAP kináz foszfatáz-1

NADA: N-arachidonoil-dopamin

NGF: nerve growth factor/idegi növekedési faktor

NKA: neurokinin A

NMDA: N-metil-D-aszparaginsav

NO: nitrogén-monoxid

PACAP: pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide/ hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid

PACAP38- IR: PACAP38- immunreaktivitás

PAR₂: proteáz-aktivált receptor 2

PCR: polymerase chain rection/ polimeráz láncreakció

PG: prosztaglandin

PGR: prosztaglandin receptor

PGE₂: prosztaglandin E₂

PIP₂: foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát

PI3K: foszfatidilinozitol-3 kináz

pJNK: c-Jun N-terminális kináz

PDGF: platelet-derived growth factor/ vérlemezke-eredetű növekedési faktor

PKA: protein-kináz A

PKC: protein-kináz C

PKG: protein-kináz G

PKR1: prokineticin receptor 1

PLC: foszfolipáz C

PLC β : foszfolipáz C β

Ppia: peptidil-prolil cisz-transz izomeráz-A

PPP2B: foszfoprotein foszfatáz 2B

qPCR: quantitative polymerase chain reaction/ kvantitatív polimeráz láncreakció

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction/ reverz-transzkripció PCR

RIA: radioimmunoassay/ radioimmunoesszé

RPL29: riboszómális fehérje L29

RTX: reziniferatoxin

SNPs: single nucleotide polymorphisms/ egy nukleotid polimorfizmus

TNF- α : tumor nekrosis faktor- α

TRG: trigeminal ganglion/ V. agyideg agyideg érző ganglionja

Trk: tirozin-kináz receptor

TRP: Tranziens Receptor Potenciál

TRPA1: Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1

TRPC alcsalád: Tranziens Receptor Potenciál klasszikus/kanonikus alcsalád

TRPM alcsalád: Tranziens Receptor Potenciál Melasztatin

TRPML alcsalád: Tranziens Receptor Potenciál Mukolipin

TRPN (nompC) alcsalád: Tranziens Receptor „no mechanoreceptor potential C”

TRPP alcsalád: Tranziens Receptor Potenciál Policisztin

TRPV1: Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1

VIP: Vazoaktív intesztinális peptid

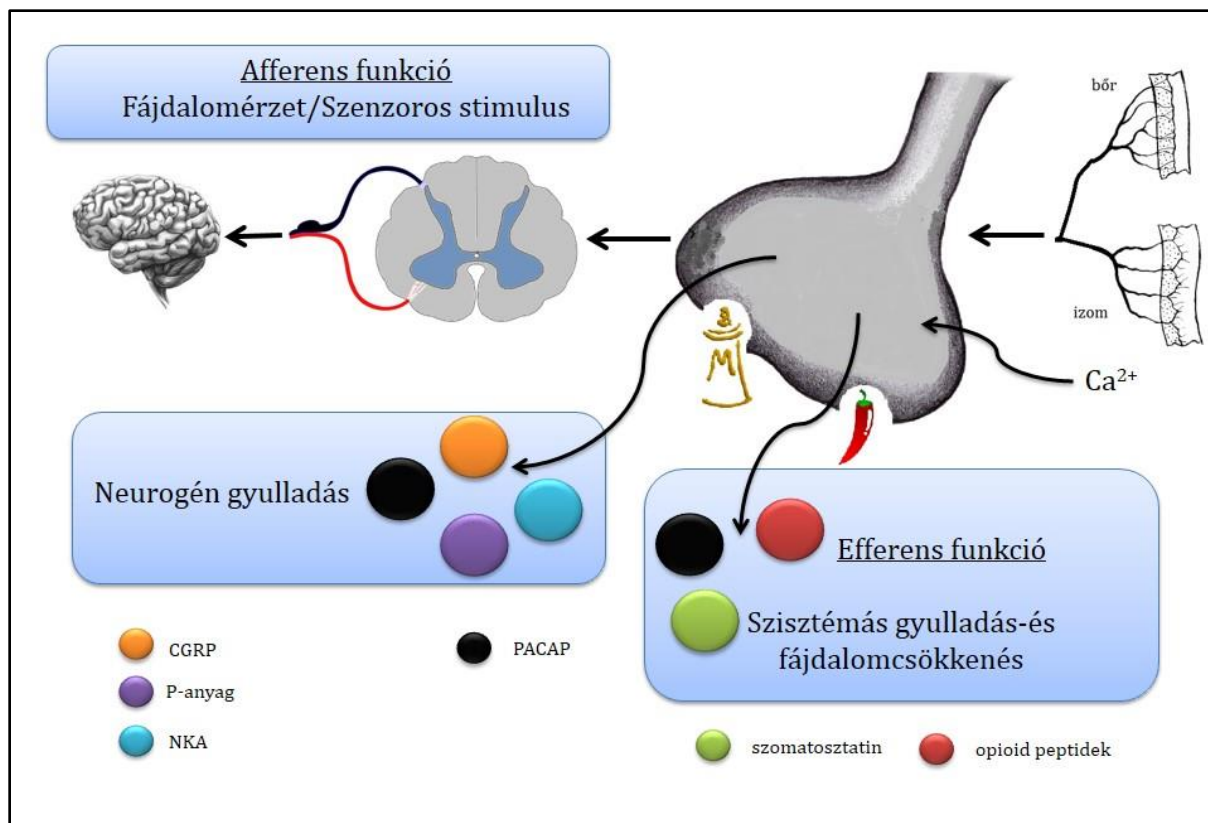
I. ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1. A kapszaicin kutatások története, a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződés és szerepük gyulladásban, fájdalomban

A kapszaicin (8-metil-N-vanillil-6-nonénamid, összegképlete $C_{18}H_{27}O_3N$) a *Capsicum* genusba tartozó paprika csípősségéért felelős vegyület, tiszta formában először John Clough Thresh izolálta [1]. A kapszaicin kémiai szerkezetét 1919-ben Nelson határozta meg, majd kémiai szintézisére 1930-ban került sor [2,3]. A kapszaicin hatásainak tudományos megközelítése és részletes leírása magyar kutatók nevéhez fűződik. Högyes Endre állapította meg, hogy a kapszaicin elsősorban az érzőideg-végződésekre hat [4], ezt követően a kapszaicin és receptorának tanulmányozása sokáig igazi magyar kutatás maradt. A II. világháborút követően, az 1950-es, 1960-as években Jancsó Miklós kutatásai alapján fény derült arra, hogy a kapszaicin kezelés nagy dózisban, illetve ismételt adások során károsítja az érzőideg-végződéseket, a kísérleti állatok egy idő után elveszítik kapszaicin válaszkészségüket. Ezt a jelenséget deszenzibilizációnak nevezzük [5]. A kapszaicin deszenzibilizáció napjainkban is szerepet játszik a klinikai gyakorlatban, mivel a magas kapszaicin tartalmú készítmények hatékonyak különböző fájdalommal járó állapotokban [6]. Szintén hazánkban született meg az a felfedezés, - mely a kapszaicin receptor molekuláris farmakológiájának alapjait jelentette - hogy a kapszaicin specifikus receptoron hat [7]. Egy évtizeddel később leírták, hogy a reziniferatoxin (RTX) a kapszaicin receptor ultrapotens agonistája, így lehetővé vált ligandkötődési kísérletek megfelelő érzékenységgű elvégzése [8,9]. Fontos azonban megjegyezni, hogy a kapszaicin/RTX deszenzibilizáció nem feltétlenül a receptorok aktivitásának csökkenése miatt alakul ki, a jelenség hátterében a kapszaicin receptort expresszáló, mérsékelten regenerálódó idegvégződések elpusztulásának is kulcsfontosságú szerepe van [10]. A kapszaicin receptort 1997-es klónozása után hamar összefüggésbe hozták a hőérzettel és nocicepcióval, amelyet a később létrehozott receptor génhiányos egértörzs tanulmányozása is megerősített [11,12], [13]. Gunthorpe és munkatársai a kapszaicin receptort molekuláris szerkezete alapján a Transiens Receptor Potenciál (TRP) receptor családba azon belül a Vanilloid csoportba sorolta be, így a receptor TRPV1 nevet kapta [14].

A TRPV1 élettani szerepének vizsgálata a receptor klónozását követően ismét nagy lendületet vett, mikor a TRPV1-et a hátsógyöki-és trigeminális gangliokban [11], majd a szenzoros neuronok C-és A δ -sejtjeiben is kimutatták [12]. Munkacsoportunk megalapítója,

Szolcsányi János fektette le az alapjait annak a felsimerésnek, hogy a kapszaicin- érzékeny peptiderg érzőideg-végződések hármaskörű funkciót látnak el: egyrészt polimodális nociceptorok, amelyek a szenzoros stimulusokat és a fájdalomérzetet továbbítják a test különféle részeiről (bőr, ízületek és belső szervek) a központi idegrendszer felé (afferens funkció), másrészt lokális és szisztémás efferens funkcióval is rendelkeznek (1. ábra). Lokális efferens hatás során a szenzoros neuronokba áramló Ca^{2+} hatására a végződésekben neurotranszmitterek, pl. P-anyag és kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP), szabadulnak fel. E lokálisan felszabaduló neurotranszmitterek következménye az arteriolák erőteljes tágulata, plazmafehérje-kiáramlás a venulákból, valamint a gyulladásos sejtek aktivációja. Az így létrejövő neurogén (steril) gyulladás bizonyítottan szerepet játszik néhány betegség, mint pl. a reumatoid arthritis, asztma, ekcéma, dermatitisz, migrén és gyulladásos bélbetegségek patomechanizmusában [15]. A TRPA1/V1 expresszáló szenzoros idegvégződések aktivációja során szomatosztatin és opioid peptidok is felszabadulnak, amelyek a véráramba kerülve a test távolabbi részeire eljutva fájdalom- és gyulladáscsökkentő hatásokkal rendelkeznek [16]. Ez a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződés szisztémás efferens hatása, melyet "szenzokrin" működésnek definiáltak [17]. A kapszaicin-szenzitív neuronokban a hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) expresszióját is kimutatták [18]. Munkacsoportunk bizonyította, hogy az érzőideg-végződésekben aktiváció hatására PACAP is felszabadul, amely a vérkeringésbe jut. Komplex, gyulladásokeltető (értágító, neutrofil-kiáramlás serkentő) és immunsejtműködéseket gátló hatásait számos modellben bizonyították. A peptid alapvető gyulladáscsökkentő és neuroprotektív hatásaival ellentétben, gyulladás- és fájdalomkeltés irányába is módosíthatja a sejten belüli folyamatokat, melyek receptorvariánsokon részben már azonosított, illetve feltételezett pleiotróp mechanizmusok révén valósulnak meg [19–22]. Munkacsoportunk írta le először, hogy a PACAP gátolja a szenzoros neuropeptidok felszabadulását és a következményes neurogén gyulladást [18,23] (1. ábra).

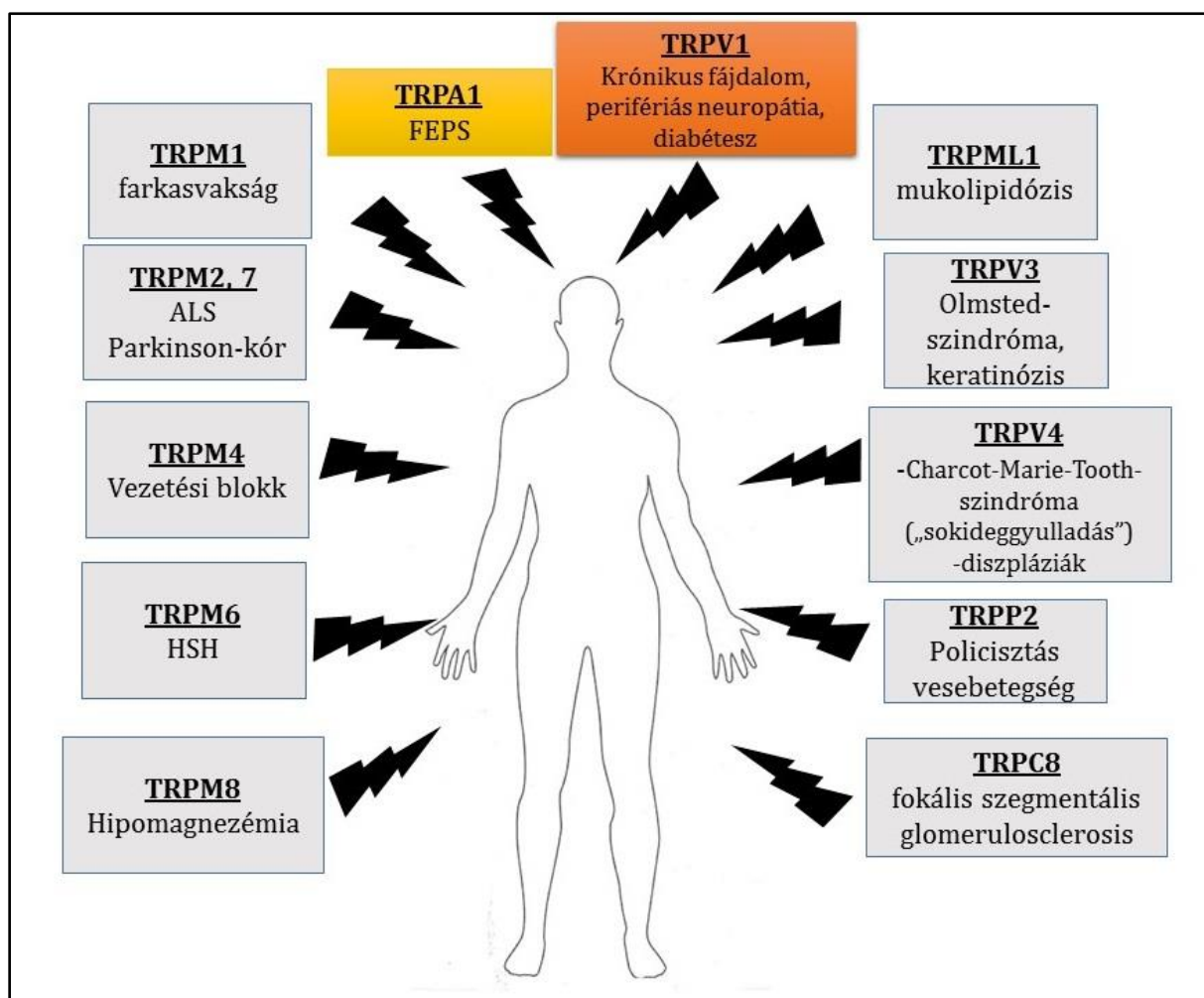


1. ábra: A kapszaicin- érzékeny érzőideg-végződések hármaskörű funkciója [24]. CGRP: kalcitonin gén-rokon peptid, NKA: neurokinin A, PACAP: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid.

2. A TRP receptorok

A TRP ioncsatornák nem szelektív kation csatornák, melyek a központi-és perifériás idegrendszer mellett számos nem-neurális szövetben és sejtípusban expresszálódnak. Sokféle exogén és endogén eredetű liganddal aktiválhatók, ligandfüggő tulajdonságaik mellett a feszültségfüggő ioncsatornák tulajdonságaival is rendelkeznek [25]. A TRP receptorok 6 transzmembrán domént tartalmaznak, amelyek homo-vagy heterotetramert alkotva alakítják ki a kation csatornát. A pórusformáló régió a két utolsó transzmembrán alegység között található. Az amino-és karboxilcsoport intracellulárisan (IC) helyezkedik el, a terminálisok előtt változó hosszúságú és szekvenciájú aminosav láncokkal. Ezek az IC régiók olyan motívumokat és szekvencia-részleteket tartalmaznak, melyek az aktiválódásban, csatornanyitásban játszanak szerepet, valamint a fehérje-fehérje és fehérje-ligand interakciókon keresztül a csatorna működését is szabályozzák. A szekvencia és szerkezeti homológia alapján 7 TRP alcsaládot különböztetünk meg: klasszikus/kanonikus (TRPC), vanilloid (TRPV), melasztatin (TRPM), policisztin (TRPP), mukolipin (TRPML), „no mechanoreceptor potential

C” (nompC, TRPN) és ankyrin (TRPA) [26]. Minden alcsalád minimum egy tagot tartalmaz, egerekben összesen 28, emberben 27-féle TRP ioncsatorna található. Mindegyik TRP csatorna kation-szelektív, ezen belül Ca^{2+} és Mg^{2+} preferenciával rendelkeznek. A nagymértékű aminosav szekvenciabeli diverzitásból adódóan a TRP receptorok számos, részletesen leírt szignál-transzdukciós és modulációs folyamatban érintettek. Részt vesznek a G-fehérje kapcsolt-és növekedési faktor receptorokon keresztüli jelátviteli mechanizmusokban, a fájdalomérzet kialakításában, és a nociceptív afferenseken is központi szereppel bírnak. Tanulmányok hívják fel a figyelmet arra, hogy egyes multifaktoriális kórképek kialakulási rizikója összefüggésben van a TRP géncsaládot érintő, a promóter vagy kódoló régióban jelentkező egy nukleotid polimorfizmussal (single nucleotide polymorphisms= SNPs) [27] (2. ábra).

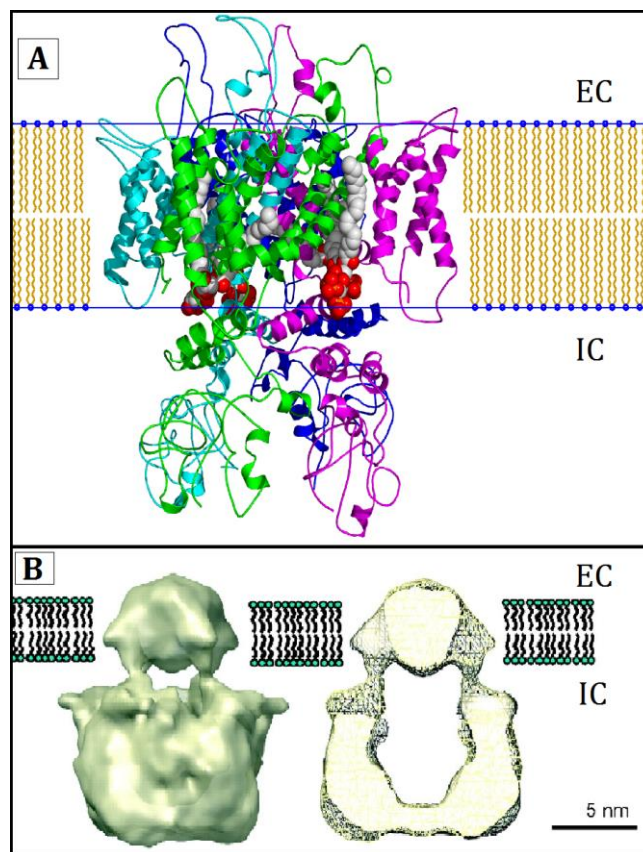


2. ábra: Bizonyítottan rendellenes TRP receptorokhoz köthető betegségek [28]. FEPS: familiáris epizodikus fájdalom szindróma, ALS: amiotrófiás laterálszklerózis, HSH: hipomagnezémia másodlagos hipokalcémiával.

A TRP receptorok expressziója bizonyított humán és rágcsáló endometriumban, az ösztrogén- és progeszteron-szinttel összefüggő decidualizáció kapcsán, ahol a TRPC1 expresszió fokozódását figyelték meg *in vitro* körülmények között [29]. A TRPV család egyik tagja, a TRPV6 jelen van a lumenális és glanduláris epitéliumban, mind emberek, mind rágcsálók esetében. A TRPV6 ciklusfüggő expressziós mintázatot mutat, fokozott génexpresszió figyelhető meg proliferatív szakaszban, illetve ösztrozban, melyet ösztrogéndominancia jellemez [30,31]. A TRPV1 receptort 2012-ben leírták humán endometriózis mintákból származó endometriális sztróma sejt kultúrában, funkcionális receptoraktivációs vizsgálatokkal is bizonyították a sejtek felszínén [32]. A TRPA1 a TRPV1-gyel jelentős kolokalizációt mutat szenzoros neuronokon, azonban endometriumbeli expressziójára kevés adat áll rendelkezésre. Krónikus kismencedei fájdalomban a nem-neurális TRPV1 és TRPA1 immunpozitivitás emelkedését írták le peritóneumban, emellett a TRPV1 mRNA expressziójának emelkedését az ektópiás endometriumsejtekben [33]. Endometriózis mintákból származó strómasejteken (prostaglandin E₂) PGE₂ és tumor nekrosis faktor α (TNF α) kezelés hatására bekövetkező TRPV1 expresszió-fokozódás szintén az extraneurális expresszió tényét támasztja alá [34].

2.1. A TRPV1 és TRPA1 receptor

A TRPV1 olyan polimodális szenzor funkciójú ioncsatorna, amely számos fizikai vagy kémiai ingerrel aktiválható. A TRPV1 receptor 838 aminosavból álló, 95 kDa molekulatömegű fehérje, 6 β -redő szerkezetű transzmembrán domén építi fel [11]. A csatornarégiót az 5. és 6. alegység közötti intracelluláris, hidrofób hurok alkotja. Ezek a struktúrák a membránban négy egységből álló tetramerré rendeződve nem-szelektív kation csatornát alkotnak (3. ábra). A patkány TRPV1 receptor bázisszekvenciája 92%-os homológiát mutat humán megfelelőjével [35,36].

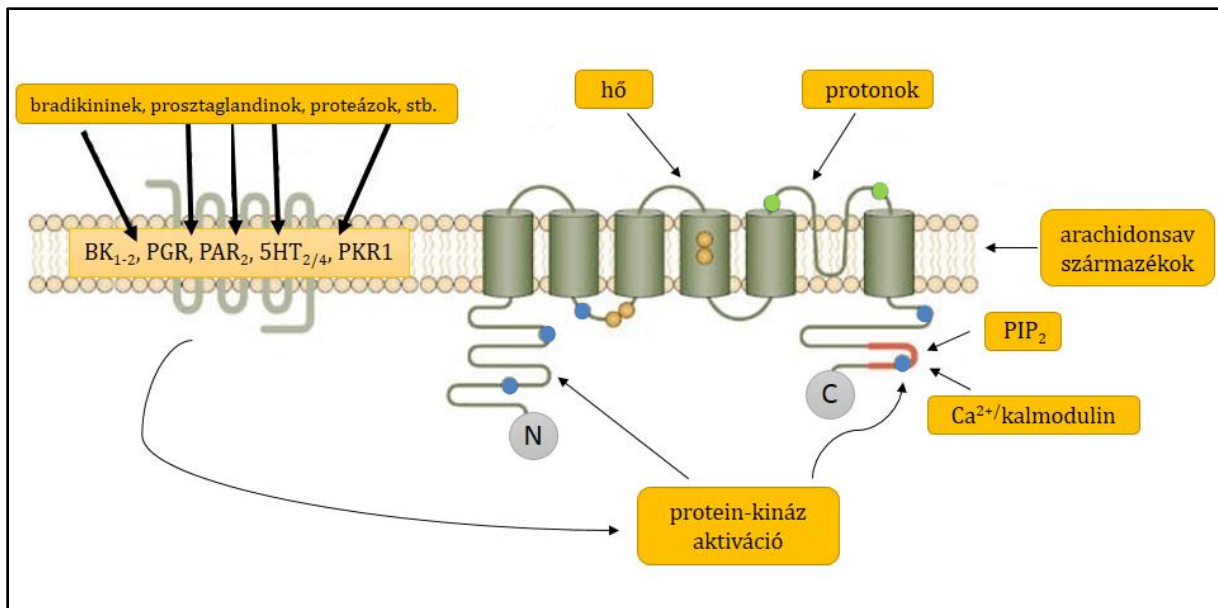


3. ábra: (A) A TRPV1 receptor szerkezete a sejtmembránban. A képen a membránba ágyazott TRPV1 szerkezete látható [37]. A csatornát a TRPV1 tetramerek alkotják (különböző színekkel jelölve). **(B)** A TRPV1 háromdimenziós szerkezetének elhelyezkedése a plazmamembránban. [38].

A TRPV1 és a TRPA1 receptorok aktivációja hasonló módon zajlik: a csatorna megnyílásával a sejtbe Na^+ - és Ca^{2+} -ionok áramlanak, melyet a K^+ -ionok sejtől való kiáramlása követ. Az intracelluláris Na^+ koncentráció emelkedése következtében depolarizáció és tovaterjedő akciós potenciál alakul ki a neuronális struktúrákon, melynek következménye a fájdalomérzet. A Ca^{2+} -ionok beáramlása elsősorban az idegvégződésekben tárolt szenzoros neuropeptidek felszabadulásához vezet, emellett fontos szerepe van a neuronok deszenzibilizációjához vezető jelátviteli útvonalak bekapcsolásában is [39]. A TRPV1 receptor elsőként tanulmányozott, legismertebb aktivátora a kapszaicin, ezen kívül azonban sokféle növényi eredetű vanilloid struktúrájú vegyület aktiválja a csatornát. Ilyen aktivátorok pl. a marokkói kutyatejféliben (*Euphorbia resinifera*) található reziniferatoxin (RTX), a feketeborsban (*Piper nigrum*) lévő piperin, a gyömbérben (*Zingiber officinale*) található zingeron vagy a szegfűszeg (*Syzygium aromaticum*) egyik aktív komponense, az eugenol. A lipofil kapszaicin általi aktivációra jellemző, hogy a vegyület átjutva a sejtmembránra, az intracelluláris régió felől közelíti meg a

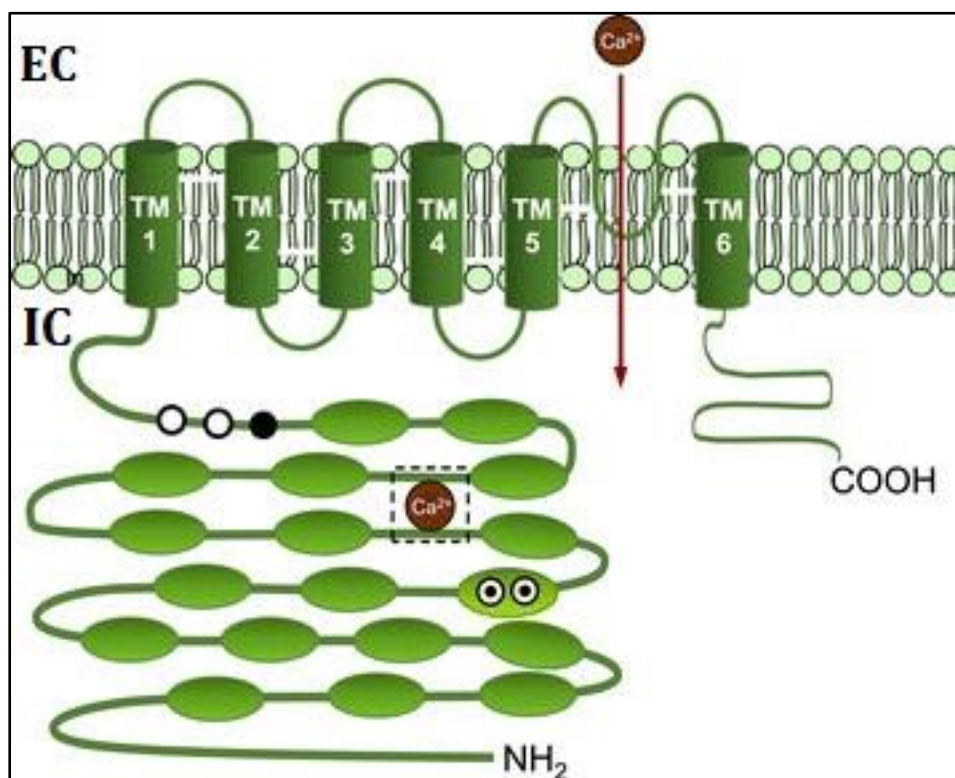
kötőhelyet és így nyitja meg a csatornát [40]. A vanilloid kötőhely a receptor IC oldalán található ún. „vanilloid zseb”, amelyet az S3 és S4 transzmembrán domének alakítanak ki [41]. A protonok által kiváltott, csatornanyitódást eredményező konformáció változásban a pórusformáló régiót összekötő extracelluláris huroknak van szerepe [42]. A fent említetteken kívül a TRPV1 receptort endogén eredetű gyulladás- és fájdalomkeltő molekula is képes aktiválni (pl. N-arachidonoil-dopamin /NADA, lipoxigenáz termékek, anandamid), vagy a perifériás idegvégződésen szenzitizálni (pl. bradikinin, adenosin-trifoszfát/ ATP, idegi növekedési faktor/ NGF, tumor nekrosis faktor α /TNF α) [43], [44] (4. ábra). A bradikinin és a prosztaglandinok G-fehérje kapcsolt receptoron keresztül, az NGF pedig tirozin-kináz A (Trk-A) receptoron, intracelluláris jelátviteli útvonalak aktiválásával foszforiláció-indukált szenzitizációt okoznak [45]. A TRPV1 receptoron számos foszforilációs hely található a protein-kináz A (PKA), protein-kináz C (PKC) és protein-kináz G (PKG) számára, a foszforiláció szenzitizálja, míg a defoszforiláció deszenzibilizálja a receptort (6. ábra). A deszenzibilizáció mértéke befolyásolható a foszfoprotein foszfatáz 2B (PPP2B, calcineurin) gátlásával [46].

A TRPV1-et nemcsak kémiai, hanem fizikai hatások is aktiválják, ezek közül a legfontosabb a fájdalmas meleg inger ($> 43^{\circ}\text{C}$) [12]. A hőérzékelésben szerepet játszó régiók (N628K, N652T, Y653T) mutációja rövidebb nyitási időt eredményez, a kapszaicin-, pH-és feszültség-érzékenység befolyásolása nélkül [45]. Fontos megemlíteni, hogy egyes nézetek szerint a TRPV1 legfőbb aktivátora a hőmérséklet, és a receptorhoz kötődő agonisták jelentős része (a pH csökkenés is) csak a receptor megnyílásához szükséges hőküszöböt csökkenti [47]. Az utóbbi évek kutatásainak eredményeként felismerték azt is, hogy a TRPV1 lipid környezetének is jelentős hatása van a receptor funkcionális tulajdonságaira. A sejtmembrán lipid raftjainak eltávolítása bizonyos esetekben (pl. a koleszterin szint csökkentése esetében) szelektíven érintette a TRPV1 agonisták hatását, míg más lipid komponensek (gangliozidok) szintjének csökkentése ligand független módon csökkentette a TRPV1 aktiválhatóságát [48].



4. ábra: A TRPV1 receptor szerkezete [49]. A **piros szakasz** a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát (PIP₂) és Ca²⁺/kalmodulin által kiváltott negatív regulációban részt vevő konzervált régiót mutatja. Az ábra bal oldalán az egyéb receptorok (**BK₁₋₂**: bradikinin receptorok, **PGR**: prosztoglandin receptor, **PAR₂**: proteáz-aktivált receptor, **5HT_{2/4}**: 5-hidroxi-triptamin receptor 2/4, **PKR1**: prokineticin receptor) aktivációjának eredményeként létrejövő TRPV1 szenzitizáció folyamata látható. A színes körök által jelzett aminosav részletek szintén fontos szerepet játszanak a receptor finomszabályozásában. **Narancssárga**: vanilloid kötőhelyek (Y511, S512, L547, T550), **kék**: protein-kináz foszforilációs helyei (S116, T370, S502, T704, S800) és **zöld**: az alacsony pH általi aktivációért felelős régiók (E600, E646).

A TRPA1 ioncsatorna nevét a polipeptid lánc N-terminális végén elhelyezkedő nagyszámú ankyrin ismétlődésről kapta (emberben ez meghaladja a tizennégyet), melyhez kutatási eredmények szerint a receptor mechanikai és kémiai stressz szenzor funkciója köthető [50] (5. ábra).



5. ábra: A TRPA1 receptor szerkezete a transzmembrán régiók, Ca^{2+} - kötőhely megjelölésével [51].

A TRPA1 aktiválódása a TRPV1 receptorhoz hasonlóan történik. A TRPA1 számos exogén és endogén liganddal aktiválható, többek közt fájdalmas hideg ingerrel ($<17^\circ\text{C}$), fahéjaldehiddel, farnezil-tioszalicilsavval, nikotinnal, hidrogén-szulfid donorvegyületekkel, formalinnal, hidrogén-peroxiddal, 4-hidroxinonenallal és akroleinnal [52], [53]. Fontos megjegyezni, hogy a receptor hőmérséklettel történő aktivációja evolúciós különbségeket mutat. Gerinctelen fajokban és hüllőkben melege, rágcsálókban hidegre érzékeny, főemlősökben már hőmérséklet inszenzitív a csatorna. A mustárolaj (allil-izotiocianát) szelektíven aktiválja a kapszaicin-érzékeny idegvégződéseket a TRPA1 ioncsatornán keresztül [54], így kizárólag neurogén mechanizmussal hoz létre gyulladást [55,56]. A legtöbb TRPA1 aktivátor elektrofil vegyület, aktiváló tulajdonságuk annak köszönhető, hogy képesek a receptor N-terminálisán elhelyezkedő nukleofil SH-csoportokkal kovalens kötés létrehozására [57]. Az előbb felsorolt vegyületeken kívül receptor aktivációt okoznak gyulladás, oxidatív stressz és szövetkárosodás

során felszabaduló endogén agonisták is [58]. TRPA1 aktivátorok továbbá a lipid peroxidáció és zsírsavanyagcsere termékei, valamint a 15-dezoxi-delta-12,14-prostaglandin J2, amely gyulladásos szignál hatására képződik egy COX enzim által katalizált reakcióban [59]. Fiziológiai körülmények között TRPA1 aktivációhoz vezet a hipertonicitás és az intracelluláris Ca^{2+} -szint megváltozása is, ez utóbbi a TRPA1 funkciójának szabályozása szempontjából központi szereppel bír. Egyrészt a sejten belüli Ca^{2+} direkt módon képes aktiválni az ioncsatornát úgy, hogy az N-terminálisan elhelyezkedő EF-hand doménhez kapcsolódik [60], másrészt a beáramló kalcium-ionok képesek potenciózni és deszenzibilizálni a csatornát. Számos G-fehérje kapcsolt receptor (GPCR), mint a BK_{1-2} , és a PAR_2 TRPA1 szenzitizációt okoz [61,62] (6. ábra).

A TRPA1 a TRPV1-gyel kolokalizációban expresszálódik a peptiderg, afferens A δ - és C-rostok egy alpopulációjában, amelyek sejttestje a hátsó gyöki és a trigeminális ganglionokban, valamint a bolygóideg érződúcaiban (ggl. jugulare, ggl. nodosum) található [54,63–65]. A TRPV1 receptort expresszáló neuronok 30-50% kifejezi a TRPA1 receptort is, míg a TRPA1 ritkán található meg TRPV1 nélküli neuronokon [66,67]. Az extraneuronális expresszió tekintetében ugyanez a tendencia figyelhető meg (pl. keratinociták, epitélsejtek) [68]. Mára számos, különböző kémiai szerkezetű vegyületről bebizonyosodott TRPA1 antagonisták tulajdonsága, azonban közülük csak néhányat vizsgáltak preklinikai fázisban. Ennek egyik oka valószínűleg az eredmények korlátozott transzlációs lehetősége, amely a TRPA1 receptor aminosav szekvenciájának fajok közötti eltérésére vezethető vissza [57], [69].

2.2. A TRPV1 és TRPA1 receptorok extraneuronális előfordulása, expressziója az uterusban és endometriózisban

TRPV1 receptor nagy mennyiségben megtalálható a hátsó gyöki és a trigeminus ganglionokban, azon belül a kis és közepes átmérőjű szenzoros neuronokon [11,12], vagyis a vékony mielinhüvelyes (A δ -) és a mielinhüvely nélküli (C-) rostokkal rendelkező neuronok sejttestjein és végződésein [70]. A TRPV1 jelenlétét évtizedekig kizárólag neuronális szöveteken feltételezték, az elmúlt években azonban egyre több, nem-neuronális sejttypuson is kimutatták. A receptort és splice-variánsait többek között leírták keratinocitákon, epidermiszben, hízósejteken, dendritikus sejteken, T-limfocitákon, epitélsejteken, vaszkuláris

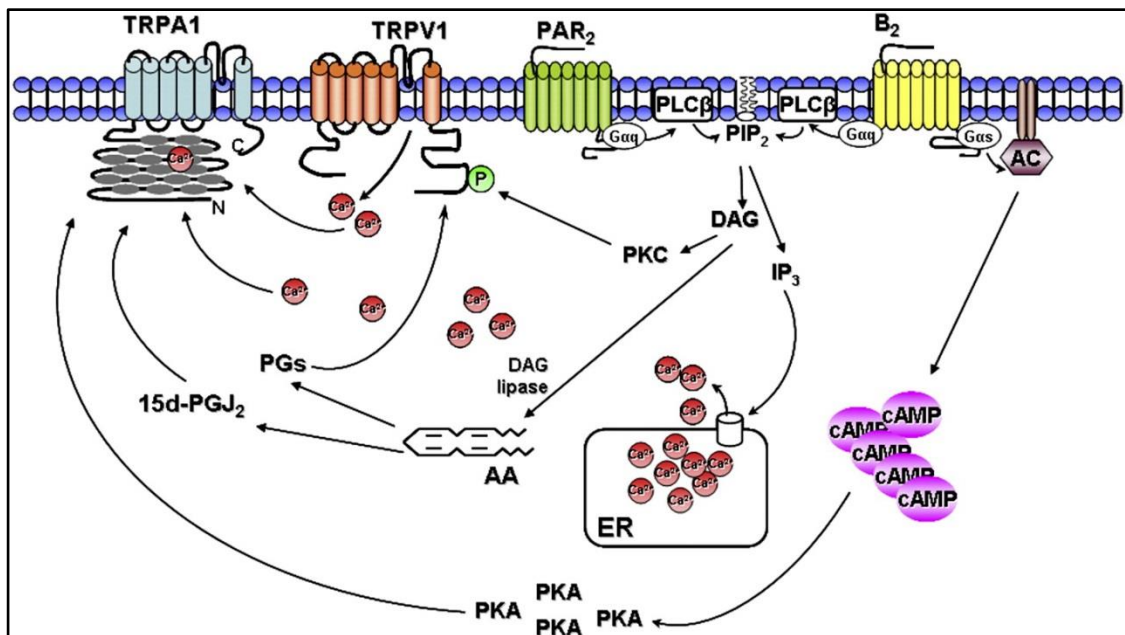
endotélsejteken, ér simaizomsejteken, az orrnyálkahártya szubmukózus mirigyeiben, az urotéliumban, gyomornyálkahártyában, a herékben, pancreasban és a méhben [42] [71]–[72]. Az ér simaizomsejteken található TRPV1 receptor aktivációja vazokonstriktort okoz, melynek szerepe a vérnyomás és mikrocirkuláció szabályozásában valószínűsíthető [73]. *In vitro* körülmények között a keratinociták felszínén található TRPV1 aktivációja gyulladáskeltő mediátorok felszabadulásához vezet [74]. Ehhez hasonló jelenség figyelhető meg a T-limfocitákon és hízósejteken expresszáldó ioncsatorna ingerlése során is [75,76]. Az utóbbi években a TRPV1 receptor humán endometriózisban történő leírása tovább árnyalta a nem-neuronális expresszió jelentőségét. Endometriózis eredetű sejt kultúrában strómasejteken PGE₂ és TNF α kezelés hatására TRPV1 expresszió-növekedést tapasztalható, TRPV1 agonista hatására pedig NO és IL-1 β felszabadulás következik be [71]. Alternatív lehetőséget jelent a humán TRPA1 receptort expresszáldó transzgenikus állatok használatának lehetősége új fájdalomcsillapító vegyület fejlesztése során.

Endometriózis eredetű krónikus kismencedei fájdalomban emelkedett extraneuális TRPA1 és TRPV1 expressziója figyelhető meg a peritoneumban, illetve emelkedett TRPV1 mRNS szint detektálható ektópiás endometrium sejtekben. Humán embrionális őssejtekből differenciáltatott szenzoros neuronokban 17- β ösztadiol és ösztrogénreceptor- β -szelektív 2,3-bisz(4-hidroxi-fenil)-propionitril hatására TRPV1 expresszió-növekedés következik be, amely a receptor ösztrogénfüggő expresszióját igazolja [33]. A TRPV1 expresszió ösztrogénfüggése magyarázatul szolgálhat az endometriózis kezelése során alkalmazott, hormonszuppressziót követő tünetcsökkenésre endometriózis-asszociált kismencedei fájdalomban.

A funkcionálisan aktív TRPA1 ioncsatornát leírták továbbá az enterochromaffin sejteken, melanocitákon, a hasnyálmirigy béta sejteiben, keratinocitákon [68,78], gyomorban, vékony-és vastagbél szöveteiben [79], belső fülben, húgyhólyagban [80], valamint méhben is [81]. A TRPA1 patofiziológiai jelentősége, potenciális gyógyszer-célpontként történő alkalmazása felmerült neuropátiás fájdalom, illetve a légutakat, a kardiovaszkuláris rendszert és a bélrendszert érintő akut és krónikus gyulladásos kórképekben [82].

Annak ellenére, hogy a nem-neurális TRPA1 és TRPV1 fiziológiai/ patofiziológiai szerepe tisztázatlan, egyfajta kapcsolat feltételezhető a nem-neurális és neurális TRP receptorok között [83,84], így a receptorok a sejt környezetében lévő potenciálisan fájdalmas fizikai és kémiai hatások integrátoraként funkcionálnak [45]. A bradikin receptor (B2) vagy a proteáz-aktivált receptor 2 (PAR2) aktiválódásának következményeként a foszfolipáz-C β enzim (PLC β) a gátló foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát (PIP2) hidrolizálásával és inozitol-trifoszfát (IP3) mediált Ca²⁺ felszabadításával direkt módon képes a TRPA1-et szenzitizálni. A protein-kináz C (PKC)

foszforiláció révén szintén szenzitizálja a receptort. Az arachidonsav (AA) metabolizmusából származó 15-deoxy-delta (12,14)-prostaglandin J(2) (15d-PGJ₂) direkt módon képes aktiválni a receptort, míg a prostaglandinok (PGs) szenzitizálják azt. A B₂ receptor stimulálja az adenilát-cikláz, amely a ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) szintjének emelkedését okozza a citoszolban, melynek eredményeként az aktivált protein-kináz A (PKA) szintén a TRPA1 szenzitiációját váltja ki (6. ábra).



6. ábra: A TRPA1 szenzitiációjában szerepet játszó intracelluláris jelátviteli útvonalak [85]. (B₂: bradikinin receptor 2, PAR₂: proteáz-aktivált receptor 2, PLCβ: foszfolipáz-Cβ enzim, PIP₂: foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát, IP₃: inozitol-trifoszfát, PKC: protein-kináz C, AA: arachidonsav, 15d-PGJ₂: [15-deoxy-delta (12,14)-Prostaglandin J(2)], PGs: prostaglandinok, cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát, PKA: protein-kináz A

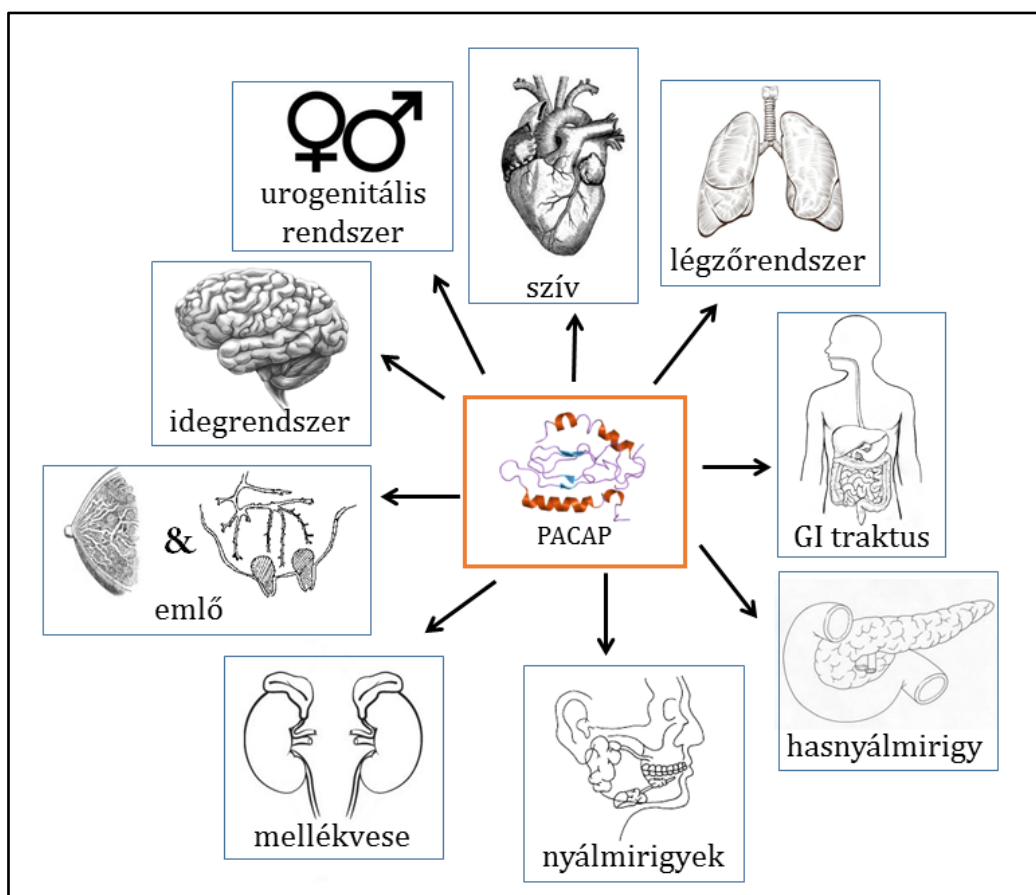
3. Szenzoros neuropeptidek és a PACAP

A kapszaicin-szenzitív peptiderg érzőideg-végződésekből aktiváció hatására szenzoros neuropeptidek szabadulnak fel (pl. CGRP, P-anyag). A CGRP felszabadulása vazodilatáció révén lokálisan megemeli a vérátáramlást az érintett területen, a P-anyag és a plazmafehérje neurokinin A (NKA) pedig az érfal permeabilitásának fokozásán keresztül következményes plazmafehérje extravazációt és a gyulladásos sejtek akkumulációját (leukocita, makrofág és hízósejt) váltja ki. Az így kialakuló összetett folyamatot neurogén gyulladásnak nevezzük. Az érzőidegvégződésekből felszabaduló szomatosztatin és opioid peptidek ezzel szemben

gyulladáscsökkentő szereppel bírnak, hatásukat a vérkeringés révén a test távoli pontjain is kifejthetik. A szomatosztatin élettani hatásai közé tartozik a növekedési hormon, hasnyálmirigy enzimek vagy a kalcitonin felszabadulásának gátlása, de a vaszkuláris simaizom és endotél sejtek, gyulladásos és immunsejtek, fibroblasztok és neuronok működését is befolyásolja. Gátló szerepet tölt be a neuronális transzmisszióban, ezen kívül megakadályozza az értágulat és hízósejt degranuláció létrejöttét, valamint a citokin felszabadulást és a sejtproliferációt. Az érzőideg-végződésekből a felsoroltakon kívül egyéb neuropeptidek is felszabadulnak, külön kiemелendő a **PACAP**. Vizsgálataink másik fókuszába ez a neuropeptid került, mivel alapvetően gyulladáscsökkentő, neuroprotektív funkcióról ismert, de a gyulladás, fájdalomkezelés irányába is komplex módon szabályozza a patofiziológiai folyamatokat a továbbiakban ismertetett módokon.

A PACAP a szekretin-glukagon-vazoaktív intesztinális peptid (VIP) peptidcsalád legkonzerváltabb tagja, izolálása 1989-ben történt meg juh hipotalamuszból. Szerkezete 68%-os egyezést mutat a VIP struktúrájával [86] (7. ábra). Az emlős PACAP különféle szignáltranszdukciós útvonalakat képes aktiválni neuronális struktúrákon, többek között aktiválja az adenilát-cikláz (AC), a foszfolipáz C-t (PLC), a mitogén aktivált protein-kináz (MAPK) és mobilizálja az intracelluláris Ca^{2+} -t [19], [87]. Emlősökben a PACAP kétféle biológiai formában van jelen: az összes PACAP mintegy 90%-át adja a 38 aminosav nagyságú PACAP 1-38, míg a 27 aminosavból álló PACAP 1-27 fragmens kisebb mennyiségben van jelen [88]. Annak ellenére, hogy a PACAP-ot rövid plazmafelezési idő, és alacsony stabilitás jellemzi, jelentős élettani hatással rendelkezik. A PACAP-ot kódoló gén klónozása és splice-variánsainak meghatározása több fajban is megtörtént, köztük egérben és emberben is [119]–[121]. Felfedezése óta a peptidet a központi-és perifériás idegrendszer mellett számos nem idegi struktúrán is leírták. A központi idegrendszerben legnagyobb mennyiségben a hipotalamuszban található, emellett expresszálódik az agykéregben, a középagyban, a bazális ganglionokban, a *hippocampus*-ban, a talamuszban és a hipofízisben, valamint a kisagyban is [90]. A perifériás idegrendszeren belül kimutatták a fájdalomközvetítő pályarendszerben: a gerincvelő hátsó szarvában, hátsó gyöki ganglionban (DRG) és az V. agyideg érző ganglionjaiban (TRG) [91], [92]. Számos nem-neuronális szövetben is expresszálódik, többek között a légző rendszerben [93–95], a szívben [96], az urogenitális traktusban [97], a hasnyálmirigyben [98], az emésztőszervrendszer teljes hosszában [99,100], az endokrin és exokrin mirigyekben [101–103], valamint humán, patkány és juh emlőben is [104–106] (7. ábra). A PACAP számos élettani folyamatban részt vesz, pl. a táplálkozásban, termoregulációban, a cirkadián ritmus és

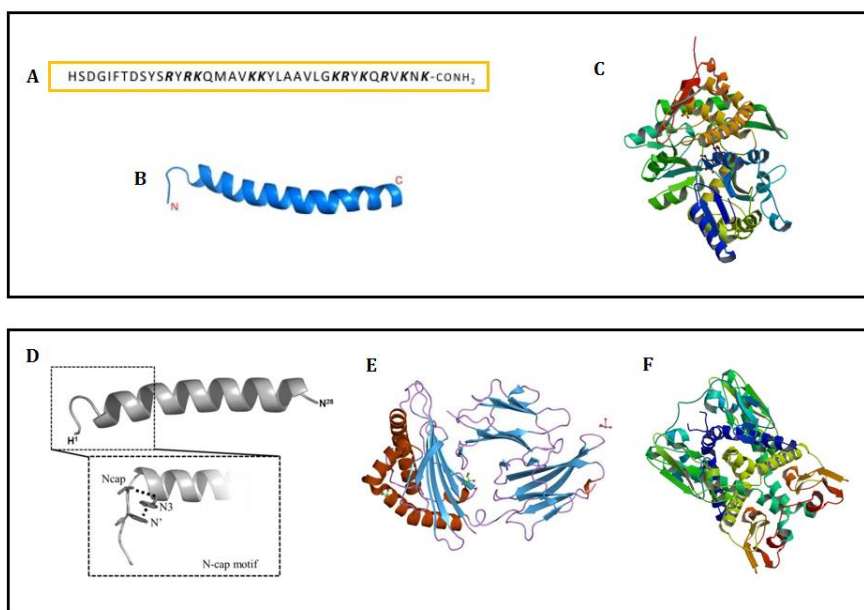
az alvás szabályozásában [107–109]. A peptid alapvetően neuroprotektív illetve gyulladáscsökkentő hatásáról ismert, neurális sejtvédő hatását számos *in vitro* és *in vivo* kísérlet támasztja alá. A PACAP protektív hatású agyi ischaemia, neurodegeneratív betegségek és agyi trauma állatkísérletes modelljeiben is [110–113]. Emellett jelentős, apoptózist gátló tulajdonsággal rendelkezik, amely nemcsak neurális, hanem egyéb sejteken (pl. T-limfocitákon, preovulációs tüsző és tüdő alveoláris sejteken) is bizonyított [114–116]. A PACAP sejtvédő hatását az antiapoptotikus fehérjék expressziójának növelésén, valamint a proapoptotikus faktorok és számos hősokk fehérje aktivitásának csökkentésén keresztül fejti ki [19].



7. ábra: A PACAP előfordulása az emlős szervezetben. GI traktus: gasztrointesztinális traktus.

A PACAP hatását a szervezetben G-protein kapcsolt receptorokon fejti ki, melyeknek két fő típusa a PAC1 és a VPAC receptorok (8. ábra). A VIP és PACAP receptorok közül először a VPAC1-t, majd később a VPAC2-t írták le [117,118]. A PACAP specifikus receptora a PAC1, melyhez a VIP-nél 2-3 nagyságrenddel nagyobb affinitással kötődik, míg a két neuropeptid a VPAC receptorokhoz hasonló kötődési hajlamot mutat. A PAC1 receptor mind G_s mind G_q

proteinekkal kapcsolódhat, míg a G_s révén az AC-n, addig a G_q protein keresztül a PLC-n keresztül megvalósuló jelátviteli útvonalat aktiválja. A VPAC receptorok két alaptípusát szekretinhez és heloderminhez mutatatott affinitásuk alapján különböztetjük meg. A VPAC1 a szekretinnel, míg a VPAC a heloderminnel mutat nagyobb kötődési hajlamot [119]. Mindhárom receptornak számos splice-variánsa ismert, a legnagyobb számú, több mint tíz splice-variánssal a PAC1 receptor rendelkezik [120].



8. ábra: A PACAP, VIP és receptoraik szerkezete. A: a PACAP elsődleges szerkezete; B: a PACAP sematikus szalagmodellje; C: a PAC1 receptor extracelluláris doménjének kristályszerkezete; D: a VIP NMR struktúrája az N-cap motívummal; E: a VPAC1 receptor extracelluláris doménjének kristályszerkezete; F: a VPAC2 receptor extracelluláris doménjének kristályszerkezete.

A PACAP receptorai széles körben előfordulnak a szervezetben a központi és perifériás idegrendszerben, valamint nem-neuronális sejtekben, pl. endokrin mirigyekben, a gonádokban, a placentában, a nyirokszervekben és az emésztőrendszerben. VPAC receptorok mutathatók ki a tüdőben, a belekben, a hasnyálmirigyben, a mellékvese kéregállományában, a herében, az ováriumban, a lép és a vese területén [117,121,122].

3.1. A PACAP szerepe a szervezet folyadéktartályaiban

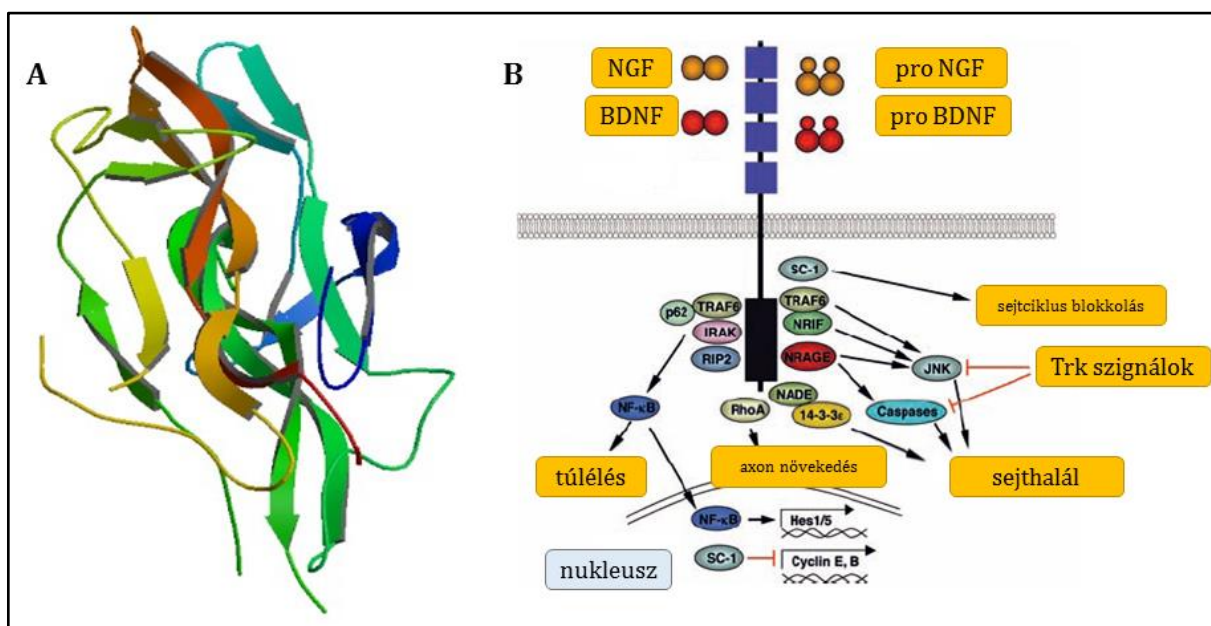
A PACAP szöveteken, szerveken túlmenően a szervezet nem-sejtes kompartmentjeiben is jelen van, amely arra utal, hogy a peptid számos további élettani és kórtani folyamatot befolyásolhat. PACAP detektálható a gerincvelői folyadékban, emberi és állati vérplazmában, tüszőfolyadékban és mind állati, mind emberi eredetű tejben [106,123–125]. A peptid kutatásának egyik alaposan vizsgált területe a plazma PACAP szintjének terhesség alatt történő változása, valamint a neuropeptid koncentrációjának anyatejben történő alterációja a szoptatás során. Várandósság alatt a második és a harmadik trimeszterben az anyák plazmamintáiban szignifikánsan magasabb PACAP koncentráció detektálható, mint az első trimeszterben illetve nem terhes nőkben. A placentában és egyéb anyai szervekben az átlagosnál nagyobb mértékű peptidszintézis folyik, és ezzel összhangban növekszik a placenta PACAP tartalma is a terhesség előrehaladtával [126]. Bizonyított, hogy a PACAP nagyságrendekkel magasabb koncentrációban van jelen az anyatejben, mint a laktáló szervezet (ember vagy állat) plazmájában, emellett a peptidet, valamint receptorát (PAC1) az emlő szöveiben is leírták, mind laktáló, mind nem-laktáló mintákban [106]. A VIP esetében ugyanez a tendencia figyelhető meg, és e neuropeptid esetében PCR vizsgálatok kimutatták, hogy mivel mRNS-e az emlőben nem detektálható, a tejbe kerülő VIP az anyai keringésből származhat [127].

Alapvetően az anyatej biztosítja a csecsemő számára a megfelelő tápanyagellátást és kórokozókkal szembeni védekező mechanizmusok első vonalát. Amennyiben azonban az anyatejes táplálás nem megoldható, a csecsemő tápanyag ellátást állati eredetű, tejalapú készítmények adásával helyettesítik. A kereskedelmi forgalomban kapható tápszerek tehéntej alapúak, melyek összetételét úgy alakították ki, hogy az anyatejhez hasonló legyen (a tehéntej több proteint tartalmaz, valamint a kazeinek és az egyéb tejsavó fehérjék aránya eltérő). Általánosságban elmondható, hogy az állati tej összetételét az állat fajtája, a takarmányozási forma, valamint a környezet is nagyban befolyásolja. Nagy mennyiségben tartalmaz különféle peptideket és fehérjéket, hormonokat, vitaminokat és növekedési faktorokat [128], antimikrobiális hatású anyagokat és immunglobulinokat [129]. A juh-és kecsketej a többi tejhez képest kiemelkedően nagy mennyiségben tartalmazza a fentebb felsorolt bioaktív anyagokat, valamint nukleotidokat és ribonukleozidokat is [130]. Egyes növekedési faktorok közvetlenül, módosítás nélkül jutnak át az anyai keringésből a tejbe, mások az emlő mirigyeiben termelődnek, mint pl. az epidermális növekedési faktor (EGF), inzulin-szerű növekedési faktor, a prolaktin (PRL) és a gonadotropin relasing-hormon (GnRH) [131]. Az eddig megismert,

anyatej összetételére vonatkozó mérési eredmények alapján arra lehet következtetni, hogy a felsorolt anyagok mellett a PACAP nemcsak közvetlenül az újszülött bélrendszerének, de felszívódva és a keringésbe jutva, egyéb szerveinek megfelelő fejlődéséhez is elengedhetetlen, emellett feltételezhetően lokálisan is hat magára az emlőre [125,132–134].

3.2. A PACAP és az agyi eredetű neurotrofikus faktor (BDNF) kapcsolata

A BDNF a neurotrofin család tagja, elsődlegesen az idegsejtek differenciálódásában és növekedésében játszik szerepet. A neurotrofinok a p75 neurotrofin-receptoron keresztül, vagy tirozin-kináz kapcsolt receptorokon keresztül hatnak (Trk-B) [134]. A család tagjai végső soron a MAPK jelátviteli útvonalon keresztül pozitív szignálokat közvetítenek, melynek eredményeként sejtnövekedés és fokozott túlélés következik be (9. ábra).



9. ábra: A BDNF kristályszerkezete (A) és a p75 neurotrofin receptorok keresztül lejátszódó jelátviteli útvonal sematikus ábrája (B) [135]. Trk: tirozin-kináz.

Annak ellenére, hogy hatásuk főként a központi idegrendszerben (KIR) tanulmányozott, multifunkcionális növekedési faktor jellegükből adódóan számos periférián zajló folyamatban is érintettek. Expressziójuk és hatásuk bizonyított a bőrben [136], a herében és a petefészekben

[137], a vesében [138] és az emlőben is [139]. Egy friss tanulmány a BDNF laktáció-dependens expresszióját írja le juhok emlőjében, ahol a BDNF-et, mint parakrin/ autokrin jelet az emlőállomány hormonális stimulációinak eszközeként, és a mikrokörnyezet kialakításában résztvevő kulcsfontosságú faktorként említi. A PACAP és a BDNF közötti kapcsolat jól dokumentált tény, első leírása Pellegrini és munkatársainak nevéhez fűződik, akik megfigyelték, hogy kérgi neuronokban és asztrocitákban a PACAP fokozta a BDNF expresszióját, és a növekedési faktor N-metil-D-aszparaginsav (NMDA) receptorokon keresztül megvalósuló hatását [136]. Számos egyéb publikáció is alátámasztja a BDNF és PACAP közötti kapcsolat jelenlétét mind idegi struktúrákon, mind pedig perifériás idegeken [140–142]. A jelenség oka a tirozin-kináz receptorok (Trk) működésében keresendő, melyek ismert ligandjaik mellett G-fehérje kapcsolt receptoron (GPCR) keresztül is keresztaktiválódhatnak. A Trk receptoraktiváció ezen formáját leírták az EGF receptor, a vérlemezke-eredetű növekedési faktor (PDGF; platelet-derived growth factor) és inzulin szerű növekedési faktor 1 esetében is [143,144]. Két GPCR ligandum, az adenozin és a PACAP a Trk receptor aktiválásán keresztül képes megnövelni neuronok és patkány pheochromocytoma sejtek (PC-12) túlélését a tirozin kináz aktivitás fokozásán és az Akt jelátviteli útvonal stimulálásán keresztül [145,146]. A PACAP közvetítette transzaktiváció mechanizmusa extraneurálisan is megfigyelhető pl. mellékvesében [147], urotéliumban [148] és simaizomsejteken [149].

4. MIF

Felfedezésekor a makrofág migrációt gátló faktor (MIF) volt az első, *in vivo* kísérletekkel bizonyítottan nem immunglobulin szerkezetű immunmediátor [150,151]. Ebben az időszakban írták le, hogy a MIF nemcsak migráció gátlást okoz, hanem képes fokozni a makrofágok felszíni adhézióját és a fagocitózist is [152]. A felfedezést követő 25 évben azonban alig született publikáció a MIF-fel kapcsolatban. A legfőbb probléma az volt, hogy a fehérjét nem tudták elegendő mennyiségben izolálni ahhoz, hogy a szerkezetét megismerve elkezdődhesse mesterséges előállítása és ez által szélesebb körű tanulmányozása. A peptid klónozására végül 1989-ben került sor [153], a végleges áttörést pedig a fehérje rekombináns előállítása jelentette 1993-ban, amely nagy mennyiségű, és tiszta MIF-et szolgáltatott a biológiai funkciók vizsgálatához [154].

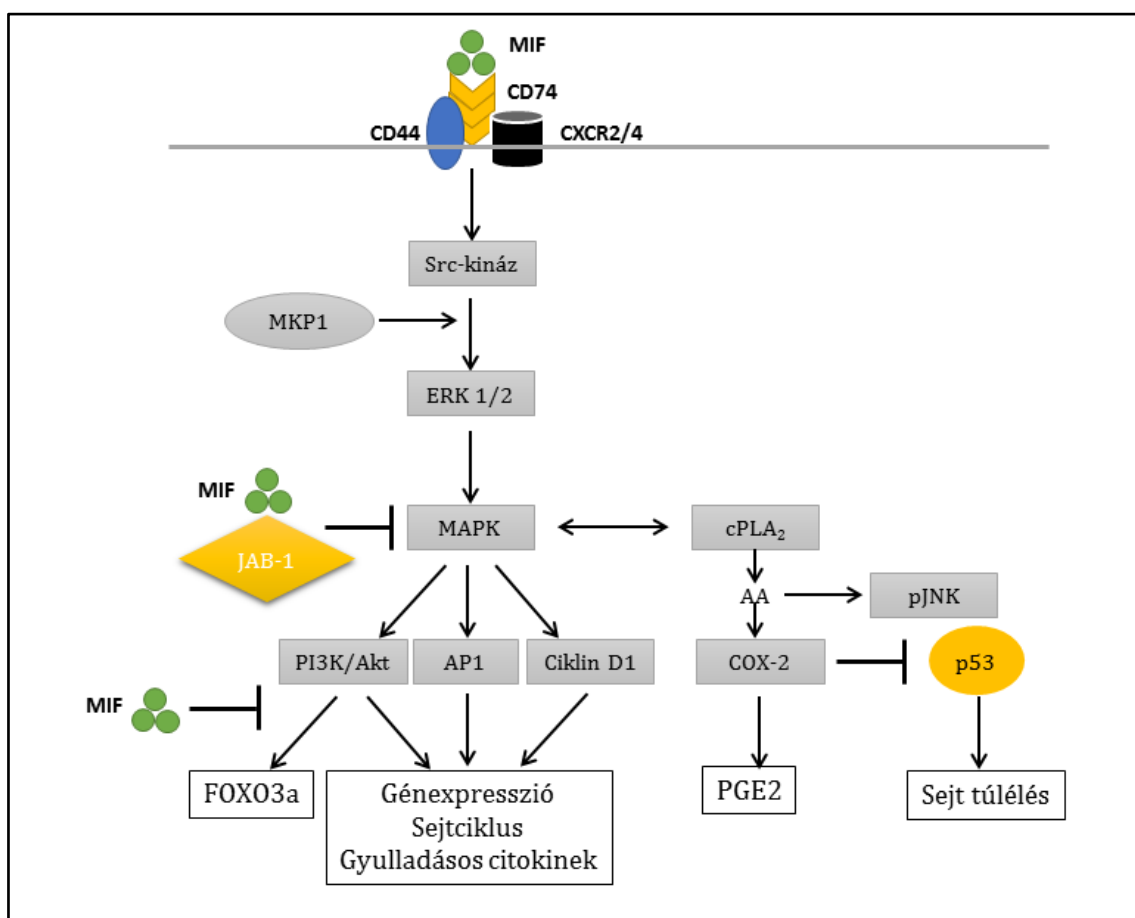
A humán MIF fehérje egy három azonos alegységből felépülő homotrimer (egy monomer 114 aminosavból áll, molekulatömege 12,5 kDa) [155], [156] (10. ábra). A MIF aminosav sorrendje nagymértékben konzerválódott az evolúció során, emlősök között a homológia 90% körüli [157], de alacsonyabb rendű élőlények körében is jelentős az egyezés. Ez a tény, valamint a MIF univerzális előfordulása az élővilágban azt sugallja, hogy a citokinnek alapvető biológiai funkciókban van jelentős szerepe.



10. ábra: A homotrimer szerkezetű humán MIF háromdimenziós szalagmodellje [158].

A MIF gyulladás során betöltött szerepe igen sokrétű. Makrofágok esetében MIF kezelés hatására a migráció elmarad, a sejtek a gyulladás helyén maradnak, fokozódik fagocitotikus képességük és hatékonyabban pusztítják az intracelluláris patogéneket [159]. A MIF fokozza egyéb gyulladásos citokinek (TNF- α , interleukin-8/ IL-1 β , interleukin-2/ IL-2, interleukin/ IL-6, interleukin/ IL-8, interferon- γ / IFN- γ) és a mátrix metalloproteinázok expresszióját, fokozza a ciklooxygenáz-2 (COX-2) aktivitását és a PGE₂ szintjét valamint elősegíti a nitrogén-monoxid (NO) felszabadulását [159-162]. A MIF egyrészt receptor-mediált módon, a CD74 sejtfelszíni molekulához kötődve kinázok (Erk1/2) aktivációja révén szabályoz, másrészt egyre több bizonyíték szól arról, hogy a MIF endocitózissal a sejtbe jutva kötődik a Jun-aktivációs domén kötő fehérje-1 (Jab-1) fehérjéhez és inaktíválja azt [162]. A Jab-1 alapvetően a c-Jun foszforilációját végzi, melynek a sejtnövekedésben és az aktivátor protein-1 (AP-1) aktivációjában van szerepe (az AP-1 számos gyulladásokeltő gén expresszióját eredményezi). A MIF és Jab-1 fennálló negatív szabályozás azt sugallja, hogy a MIF-nek nem csupán a

gyulladás-keltő hatásai vannak, hanem hatásspektrumának lehet gyulladás-csökkentő része is (11. ábra). A MIF-nek számos betegség patogenezisében tulajdonítanak szerepet: endotoxémia és exotoxémia [163], [164], késői típusú hiperszenzitivitás [165], glomerulonefritisz [166], artritisz [167], transzplantátum kilökődés [168], gyulladásos bélbetegségek [169], akut respiratorikus distressz szindróma [170], atheroszklerózis [171], anémia [172], encephalomyelitis [173] valamint tumornövekedés és angiogenezis [174]. A MIF-ről bebizonyosodott, hogy szerepet játszik az ez endometrium sejtek proliferációjában és egyes tanulmányok szerint az endometriózis egyik megbízható biomarkere [31], [175].



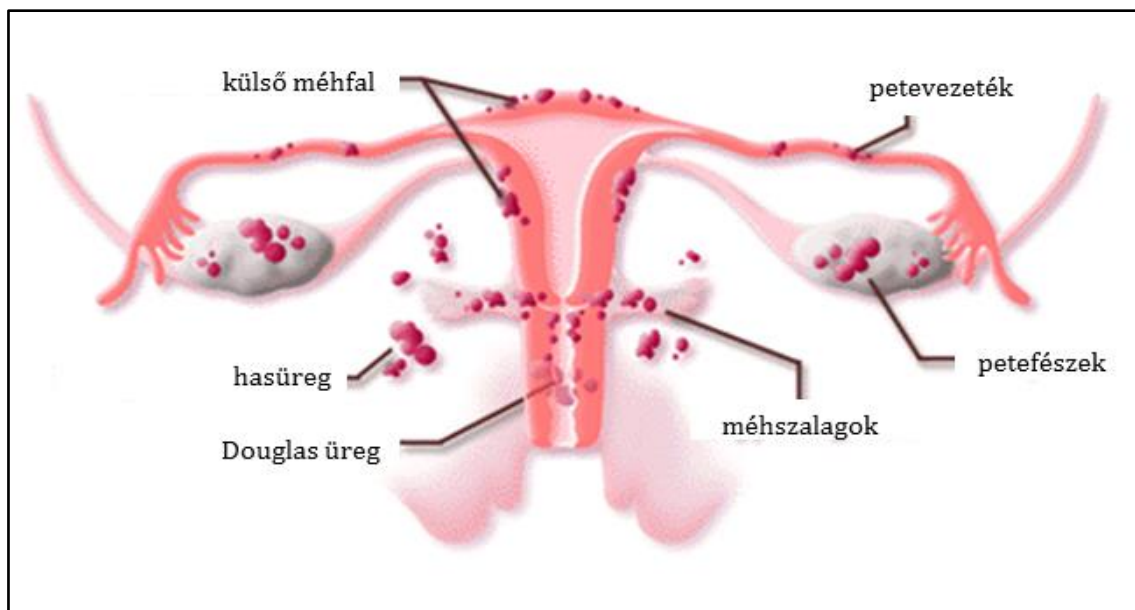
11. ábra: A MIF által kiváltott szignáltranszdukciós útvonal sematikus ábrája [176]. A MIF extracelluláris oldalon kötődik a **CD74** és **CD44** transzmembrán receptorokhoz, ezzel **Src** kináz által katalizált foszforilációs kaszkádot indít el (**ERK1/2**, **MAPK** foszforilálódik). Ez a folyamat az **AP1** és **PI3K/Akt** túlélési útvonal aktivációjához, és **Ciklin D1** szint emelkedéséhez vezet. **CXCR 2/4**: CXC kemokin receptor 2/4, **MAPK**: mitogén-aktivált protein kináz, **MKP1**: MAP kináz foszfatáz-1, **ERK 1/2**: extracelluláris szigál-regulált protein kináz 1/2, **cPLA₂**: citoszolikus kalcium-dependens foszfolipáz A2, **AA**: arachidonsav, **pJNK**: c-Jun N-terminális kináz, **COX-2**: ciklooxygenáz-2, **PGE2**: proszttaglandin E2, **AP-1**: aktivátor protein-1, **PI3K**: foszfatidilinozitol-3 kináz, **FOXO3a**: Forkhead box O3.

A MIF fent szemléltetett szerteágazó pro-és antiinflammatorikus hatásain felül saját enzimaktivitással is rendelkezik, amely tulajdonsága miatt citozimnek, vagy szekretált enzimnek is nevezik. A MIF tautomeráz reakciójának szubsztátja lehet fenilpiruvát, p-hidroxi-fenilpiruvát is, melyek keto-enol tautomeriáját katalizálja a citokin [177]. Annak ellenére, hogy katalitikus aktivitásának szerepe nem teljesen tisztázott, feltételezik, hogy az enzimaktivitás kismolekulákkal történő gátlása hatékony terápiás lehetőség lehetne egyes autoimmun eredetű gyulladásos betegségek gyógyításában.

5. Az endometriózis patomechanizmusa

Az endometriózis olyan komplex gyulladásos kórkép, amely esetében működő endometrium szövet (endometriális mirigyek és sztróma) található a méhürön kívül. A fejlett országokban ez a harmadik leggyakoribb oka a nőgyógyászati eredetű kórházi ápolásnak és a vezető oka a méheltávolításnak [178]. Az endometriózissal diagnosztizált betegek életminősége jelentősen romlik, összefüggés mutatható ki mind a fogamzó képesség, mind a krónikus fájdalom miatt bekövetkező munkából való kiesés tekintetében [179].

Az endometriózis léziók megjelenési helye szerint beszélhetünk *endometriosis interna*-ról, mikor az elváltozás az uterus falán belül a miometriumban található, ezt *adenomyosis*-nak nevezzük. (12. ábra). Másik fajtája az *endometriosis externa* (méhen kívül kialakult endometriózis) és *endometriosis extragenitalis* (bármely szervben előfordulhat) kórképekről. *Endometriosis externa* leggyakrabban ovariális (petefészek), retrocervikális (a méhszáj területétől caudalisan), peritoneális (hashártya) és vaginális területeken alakul ki. Az endometriózis leggyakoribb tünetei a: *dysmenorrhea* (DM, súlyos, ciklusos fájdalom, amely a kismencedei összenövések és vérzés következménye), *dysuria* (fájdalmas vizezés), *dyspareunia* (fájdalmas közösülés), *dyschezia* (fájdalmas székelés) és az infertilitás. *Endometriosis extragenitalis* esetében a beteg beszámolhat ciklussal összefüggő *haematuria* (véres vizezés) vagy rektális vérzés megjelenéséről, amennyiben a hólyag vagy a végbél transmurálisan érintett. A betegség megjelenésének ezt a formáját mélyen infiltráló endometriózisnak (*deep infiltrating endometriosis/ DIE*) nevezzük [180].



12. ábra: Az endometriotikus léziók leggyakoribb előfordulási helyei (forrás: www.sensiseeds.com).

Az endometriális léziók kialakulásának okára több teória is született. A legelső, *Sampson-teória* [181] szerint a betegség retrográd menstruáció eredetű, azaz a peritoneális űrbe jutó endometrium sejtek túlélése és megtapadása vezet a betegség megjelenéséhez. Ez az elmélet azonban csak a peritoneális endometriózist magyarázza, emellett ellentmondás az is, hogy a fiziológiásan is végbemenő retrográd menstruáció mindössze a nők 5-10%-ban vezet endometriózis kialakulásához [182]. A *metapláziás-teória* szerint a betegség cölómahám eredetű, azaz a cölómahám eredetű metaplasztikus szövetek differenciációja endometriumként zárul [183]. Egyes szakemberek a metapláziás-teória egy kibővített formáját, az *indukciós teóriát* tartják elfogadottnak, melynek értelmében a léziók lehetnek menstruációs eredetűek, de megtapadásukhoz más, szolubilis faktorok faktor is nélkülözhetetlenek [184].

Az endometriózis kialakulásában és progressziójában az ösztrogén szerepe bizonyított. A betegség menopauzában ritka, posztmenopauzában történő megjelenését exogén ösztrogénhatású vegyületek, szelektív ösztrogén receptor modulátor kezelés, vagy ösztrogén szubsztitúciós terápia okozhatja. Az endometriózis családi halmozódást mutat, az olyan nők esetében, akiknek elsőfokú rokonai között diagnosztizált endometriózis van, tízszer nagyobb a betegség gyakorisága [185].

5.1. Az endometriózis osztályozása

A legelterjedtebb osztályozási rendszer a heterotop endometrium szigetek nagysága, elhelyezkedése, színe, a betegség súlyossága illetve az összenövések alapján (melyeket pontokkal fejezünk ki) négy stádiumot különböztet meg (ASRM osztályozás-Endometriosis Classification for Infertility Subcommittee of the American Society for Reproductive Medicine).

I. stádium (minimális, 1–5 pont): a kismedence-peritóneumon szétszórta, 5 mm-nél kisebb, nodusokat nem alkotó elváltozások összenövés nélkül.

II. stádium (enyhe, 6–15 pont): 5mm-nél nagyobb endometriumszigetek, melyek megjelennek a *sacrauterin* szalagokon, és nodusokat is képeznek.

III. stádium (mérsékelt, 16–30 pont): kiterjedt, egymással összekapaszkodó implantátumok, helyenként csokoládé cisztát képezve, kismedencei összenövésekkel.

IV. stádium (súlyos, 31–54 pont): extragenitális lokalizáció súlyos összenövésekkel.

5.2. Az endometriózis kezelése

Az endometriózis terápiája a kórkép gyulladásos és hormonális komponensei miatt nagyfokú körültekintést igényel. A fertilis korú betegek nagyfokú érintettsége miatt a családtervezés kiemelt fontosságú a terápiás döntés meghozatalában. A gyógyszerek közötti választás főleg a mellékhatásuktól függ, mivel az endometriózis eredetű fájdalmat hasonló mértékben csökkentik. Gyógyszeres terápiában leggyakrabban gesztagéntúlsúlyos monofázisos fogamzásgátló tabletta; gesztagének; danazol (napjainkra kiszorult a terápiából a nehezen tolerálható androgén mellékhatásai miatt); GnRH analóg-és antagonsita készítmények; antiprogesteronok (az alapbetegséget nem gyógyítják, a fájdalmat csökkentik); nem szteroid gyulladáscsökkentők (az alapbetegséget nem gyógyítják, a fájdalmat csökkentik) folyamatos, vagy időszakos alkalmazására kerül sor. A gyógyszeres kezelések célja az ektópiás endometrium atrófiája hormonális úton (kivéve a nem szteroid gyulladáscsökkentőket). Valószínűleg nem befolyásolják a betegség kialakulásában szerepet játszó alapvető biológiai folyamatokat és nem mindig eredményeznek teljes tünetmentességet, gyakori a tünetek visszatérése a kezelés után.

Egyes esetekben a kombinált fogamzásgátló készítmények univerzális hatékonyságának elmaradása magyarázható az ektópiás endometrium szövet csökkent vagy hiányzó progeszteron receptor expressziójával, amely a progeszteronválasz elmaradását és a proliferatív hatások túlsúlyba kerülését eredményezi [186].

A gyógyszerterápia sikertelensége esetében szervmegtartó laparoszkópiás beavatkozás választandó, melynek célja az elváltozások és összenövések sebészeti megszüntetése. Az elváltozások teljes eltávolítása általában lehetetlen, ugyanis egy részük gyakran nem látható. A laparoszkópos beavatkozást követően gyorsabb a felépülés, kevesebb a poszt operatív adhézió és szövődmény a laparotómiához képest. Súlyos fokú endometriózis esetén azonban szükségessé válhat radikális sebészi beavatkozás. Bél, ureter érintettsége rezekciót tehet szükségessé. Sebészeti megoldást választunk, ha a beteg változókorban van, családtervezése lezárt, és az endometriózis elváltozás mindkét petefészket roncsolja [187]. A legjobb eredmény a kombinált kezeléstől várható, melynek során először laparoszkópia segítségével megtörténik az endometriózisos léziók excíziója illetve az összenövések oldása. Ezt követően 3-9 hónapon át tartó GnRH- analóggal történő kezelés következik, majd a kezelés kontroll laparoszkópiás vizsgálattal illetve ultrahang-vizsgálattal zárul.

Általánosságban elmondható, hogy minden gyógyszeres kezelés egyformán hatékony az endometriózis kezelésében, tüneteinek javulásáról a betegek kb. 80-85%-a számol be [188]. Sajnos előfordul, hogy a gyógyszeres kezelés a léziókat nem szünteti meg, csupán elnyomja őket, emellett pedig az eutóp endometrium szövet is inaktívvá válik, amely infertilitáshoz vezet.

II. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatómunkám általános célkitűzései a következők voltak:

1) A TRPA1 és TRPV1 receptorok, valamint a MIF expressziójának és hormonfüggő regulációjának vizsgálata patkány endometriumban

A TRPA1 és TRPV1 receptorokat kimutatták humán eutópiás és ektópiás endometriumban, regulációjuk és funkciójuk azonban nem ismert. Ezen túlmenően a női nemi hormonok szintjének e receptorokra kifejtett hatását illetően nem állnak rendelkezésre adatok. Állatmodellek segítségével lehetőségünk nyílik a szexuális érés során bekövetkező változások precíz feltérképezésére, az ösztrogén és gesztagén hatások tisztázására. Célul tűztük ki ezért a TRPA1/V1 receptorok expressziójának vizsgálatát mRNS és fehérjeszinten, valamint hormonfüggő változásaik feltérképezését a MIF-el összehasonlítva patkány endometriumban.

2) A TRPA1 és TRPV1 receptorok vizsgálata DIE-ban

A megfigyelt hormonfüggő TRPA1 és TRPV1 expresszió-fokozódás fényében felmerült bennünk a kérdés, hogy milyen expressziós mintázatot, alterációt mutatnak a vizsgált receptorok endometriózisban, illetve hogy milyen klinikai paraméterekkel állnak összefüggésben. Ezt a klinikai témát célzó vizsgálatunkat a Pécsi Tudományegyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájával együttműködve, Dr. Bohonyi Noémivel közösen végeztük. Vizsgálataink során a laboratóriumi kísérletek tervezését, a vizsgált gének expressziójának meghatározását, immunhisztokémiai vizsgálatokat jómagam, míg Bohonyi Noémi az orvosi csapat tagjaként a klinikai minták gyűjtését, valamint a klinikai-és fájdalomparaméterek meghatározását végezte.

3) A PACAP meghatározása juhok emlőjében és tejében, valamint plazmájában

Számos tanulmány adatait alapul véve egyértelművé vált, hogy a PACAP és receptorai megtalálhatóak mind humán, mind gazdasági állatok emlőjében és tejében egyaránt. Életkor függő expressziós mintázatukkal, valamint a szopást követő PACAP koncentráció változással kapcsolatban irodalmi adatok nem ismertek. PhD kutatásom e részében célul tűztük ki a) a PACAP koncentrációjának vizsgálatát az idő függvényében szopás után bárányokban; b) a plazma PACAP koncentráció összehasonlítását nőtény juhokban, 3 korcsoportban (bárány, fiatal felnőtt és idős egyedek); c) a PACAP mRNS-és fehérjeszintű vizsgálatát a fenti három

korcsoport emlőmintáiban; d) a PAC1 receptor, a VIP, valamint a BDNF génexpressziós szinten történő meghatározását emlőmintákban, hogy a PACAP szignaliációjához és funkcionális jelentőségéhez közelebb jussunk.

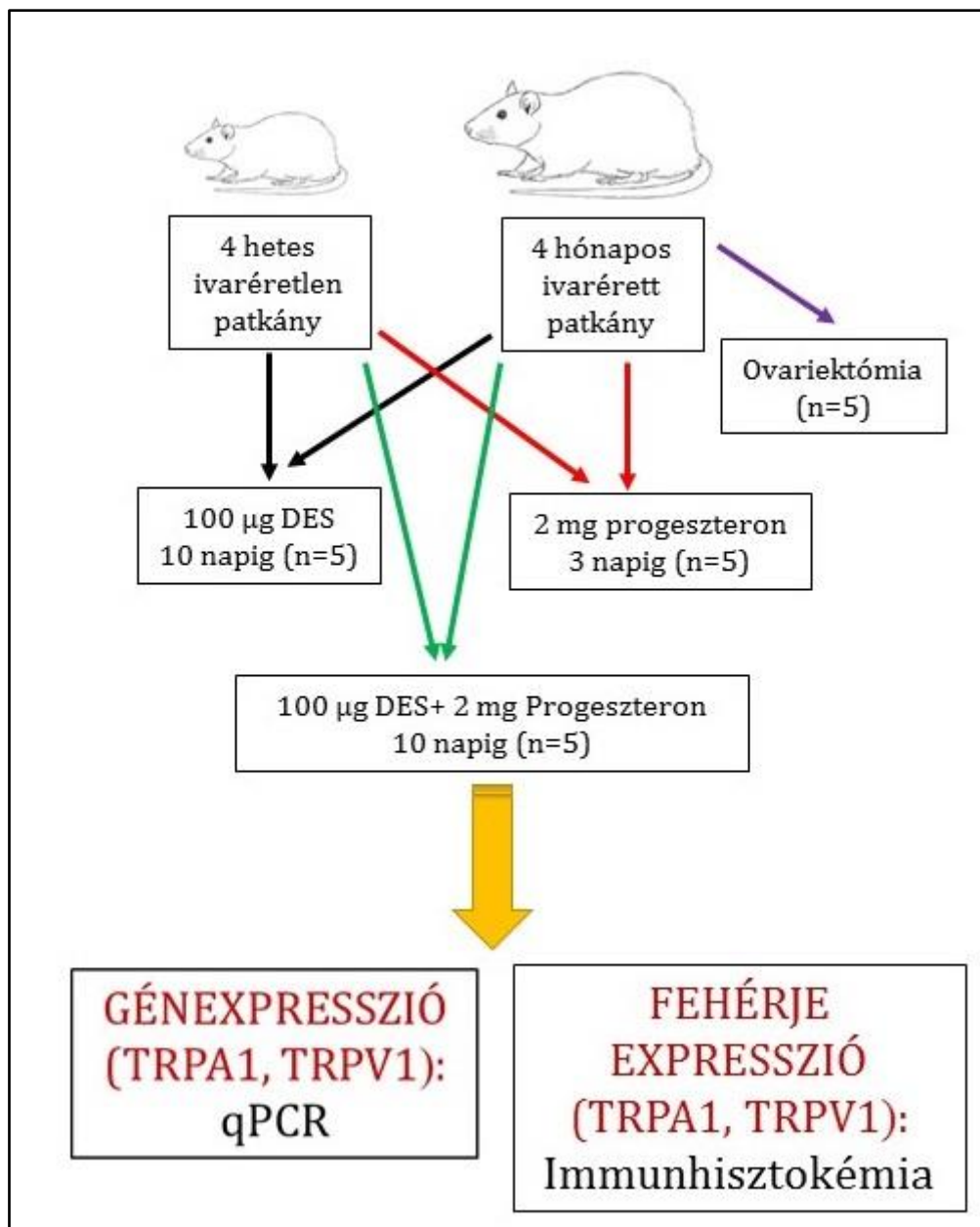
III. KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

1. Mintagyűjtés

1.1. Patkány minták gyűjtése, alkalmazott kezelések

Vizsgálataink során 4 hetes ivaréretlen, valamint 4 hónapos ivarérett nőstény Wistar patkányokat használtunk. A patkányok tartása a PTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetének Állatházában, 24–25 °C-on, standard rágsáló táppal és víz *ad libitum* fogyasztásával, 12 órás sötét ciklusban történt. *Etikai engedélyszám: BA02/2000-11/2011.*

Mindkét korcsoportból 5-5 egyededet méhviaszban oldott és nyakbőr alá beültetett, 100 µg szintetikus ösztrogén analóg dietilstilbösztrolt (DES) tartalmazó implantátummal kezeltük 10 napon át (DES felszabadulás: ~2 µg/nap). További 5-5 patkány 2 mg szezámolajban oldott progeszteront kapott *subcutan* (s.c.) adással 3 egymást követő napon át. Kombinált kezelés során további 5-5 egyed a DES pellett implantációt követő második napon részesült progeszteron kezelésben [189]. Az ivarérett nőstények egy csoportjában (n=5) ovariectómiát végeztünk, a csökkent nemi hormon szintjének tanulmányozása érdekében. Kontrollként placebo kezelt (méhviasz implantátum aktív hatóanyag nélkül, n=5) állatokat használtunk. Az alkalmazott *in vivo* kezeléseket a 13. ábra foglalja össze.



13. ábra: Az *in vivo* alkalmazott kezelések összefoglalása. DES: dietil-stilbösztrol, qPCR: kvantitatív polimeráz láncreakció

A minták gyűjtése a kísérleti csoportoktól a kezelések után 10 nappal történt, negatív kontrollként placebo kezelt, valamint álműtött egyedek szövetmintáit használtuk. Az állatok terminálását túlaltatással végeztük (50 mg/kg tiopental-nátrium injekció intraperitoneálisan; Sandoz, Kundl, Ausztria), ezután történt meg az uterus eltávolítása. Az endometriumot elválasztottuk a miometriumtól, majd egy részét RNA-Later oldatba (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), másik részét 4%-os paraformaldehid oldatba helyeztük, majd paraffinba ágyasztuk.

1.2. Klinikai minták gyűjtése, vizsgálati csoportok

A klinikai minták gyűjtését Dr. Bohonyi Noémi végezte a PTE KK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikán. A klinikai aspektusok bemutatása az ő PhD értekezésének része, jelen dolgozatban csak a molekuláris eredmények értelmezéséhez szükséges legfontosabb betegadatokat ismertetem. A humán műtéti minták 28 betegtől (kor: 18-45 év) származtak, akik 2013 és 2014 között álltak kórházi ellátás alatt krónikus DM vagy csökkent fertilitás (szubfertilitás) miatt. *Etikai engedélyszám: 5816.*

A begyűjtött minták az alábbi csoportokba oszthatók:

1-es csoport (n=15): *rectosigmoid* DIE, súlyos DM

2-es csoport/ kontroll csoport (n=7): fibroid indukált mérsékelt DM

3-as csoport (n=6): tubális eredetű infertilitás fájdalom nélkül

Kísérletekből való kizárást vont maga után a terhesség, menopauza, hormonális fogamzásgátló szedése vagy *intrauterin* fogamzásgátló eszköz használata a műtétet megelőző 3 hónapon belül, endometriózis és méh fibroidok együttes jelenléte, diffúz adenomiózis, egyéb diagnosztizált krónikus betegség vagy tumor, illetve akut gyulladásos állapot valószínűsége laboratóriumi paraméterek alapján. A vizsgálatban részt vevő összes beteg beleegyező nyilatkozatot írt alá.

Az általunk kialakított vizsgálati csoportok felosztása a következő:

1. autológ endometrium [endometriózisos betegek eutópiás endometriuma (n=7)]
2. DIE lézióból származó ektópiás endometrium (n=15)
3. egészséges szigmbél fal minta a műtéti rezekciós szélről 5 cm-re (n=15)
4. méh fibroid miatt műtött DM-ben szenvedő betegek endometriuma [negatív kontroll (n=7)]
5. nem-endometriózis eredetű infertilitás miatt kezelt, de egyéb nőgyógyászati panasztól mentes betegek egészséges endometriuma [nőgyógyászati kontroll (n=6)].

Kísérleteinkhez proliferatív szakaszból származó endometrium mintákat használtunk, a ciklus napjának számítása az utolsó menstruáció első napjától kezdődően történt, kalkulációnkat a méhnyak vizsgálata is megerősítette. A mintákat kürettel vettük, a rezekciót követően az egyik részt azonnal RNA-Later oldatba, a másik részt 4%-os paraformaldehid oldatba helyeztük majd paraffinba ágyaztuk.

1.3. Juh minták gyűjtése, vizsgálati csoportok

Vizsgálataink során az őshonos cigája juh fajta plazma-, tej-és emlőmintáit használtuk. A juhek ugyanarról a tenyésztőtelepről származtak, takarmányozásuk *ad libitum* történt. Az állatok hizlalása egy istállóban, kiscsoportos, mélyalmos tartástechnológiában valósult meg. *Etikai engedélyszám: 28/2012 DE MAB.*

A felhasznált állatokból az alábbi kísérleti csoportokat alakítottuk ki:

1. A szopással összefüggésben vizsgált PACAP38 immunreaktivitás (PACAP38-IR) meghatározásához szükséges vérmintákat 3 hónapos szopós bányók (n=9) nyaki vénájából vettük szopás előtt (t=0) és szopás után 1 (t=1 h), illetve 2 órával (t=2 h). Összehasonlításként a bányók anyjának nyaki-és emlővénájából vért vettünk, illetve tejmintát gyűjtöttünk (n=8).
2. A plazma PACAP és VIP koncentrációjának összehasonlítását, valamint az emlő PACAP (mRNS és fehérje), VIP és BDNF mRNS szintű analízisét 3 korcsoportban [bányó, fiatal és idős egyed (n=4/ csoport)] végeztük el az állatok emlőmintáiban.

Vérminták gyűjtése

Mintavétel előtt az érintett bőrfelszínt minden esetben fertőtlenítettük. A mintákat etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA, 18 mg) és TrasyolTM-t (1200 U) tartalmazó hideg Vacutainer® (BD Life Sciences, Franklin Lakes NJ, USA) vérvételi csövekbe gyűjtöttük, majd centrifugálást követően (200 g 10 percig, majd 2500 g 10 percig, 4°C-on) a felülúszót (plazma) elválasztottuk és felhasználásig -80°C-on tároltuk.

Tejminták gyűjtése

A vizsgált bányók anyajuhaiból származó tejminták esetében, a mintagyűjtést reggel végeztük, mindegyik anyaállattól hűtött centrifugacsövekbe 25 ml tejmintát vettünk. A mintákat mintavétel után azonnal -80°C-ra helyeztük. A PACAP38-LI cirkadián változásainak

feltérképezése érdekében 4 anyaállatból további tejmintákat gyűjtöttünk (5 ml/ állat/ időpont) az előbbieken részletezett módon, a következő időpontokban: 04:00, 08:00, 12:00, 16:00, 20:00 és 24:00.

Az állatok leölése és szöveti mintavétel

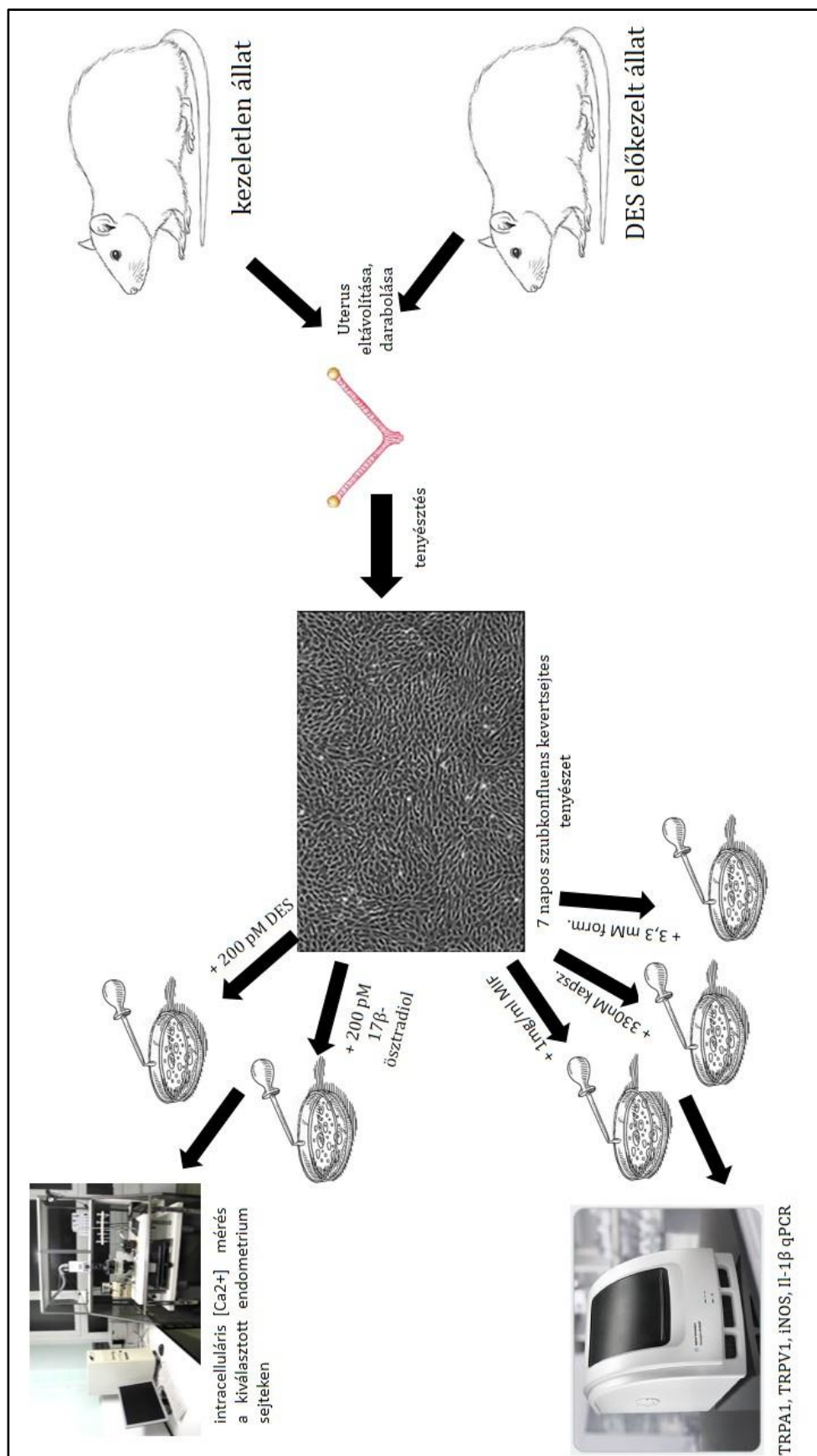
A vizsgált gének és a fehérjék szöveti expresszióját juh emlőben poszt mortem vizsgáltuk. Az állatok leölése az Európai Unió Tanácsa által elrendelt, az állatok védelméről és kíméletéről szóló, 1993. december 22-i 93/119/EK szabályait követve történt. Az állatok mindegyikétől a nyaki vénából 10 ml vérmintát vettünk, illetve 1-1 cm³ emlő- (mirigyes komponens) és uterus mintát. A szövetminták egy részét RNA-Later oldatba (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), másik részét natívan először folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd -80°C-on tároltuk.

2. Primer uterus sejtenyészet és az alkalmazott *in vitro* kezelések

4 hetes nőtény patkányok méheiről mélyaltatásban steril úton eltávolítottuk, a mintákat apró darabokra vágtuk, majd steril inkomplett (Ca²⁺ és Mg²⁺ mentes, pH 7,4) Hank's- oldatba (HBSS) helyeztük, amely kiegészítésként 1 M HEPES-t, 2% antimikotikum/ antibiotikum keveréket és 1 M nátrium-hidroxidot tartalmazott. A mintákat 0,1 % kollagenázt és 0,005% DNáz I-et tartalmazó 10 ml HBSS-oldatban inkubáltuk 37°C-on 30 percig, majd ezt követően 0,01% tripszin és 0,005% DNáz I keverékével emésztettük 37°C-on 5 percig. A mintát ezután háromszor mostuk HBSS oldatban, majd a sejtek ültetését 8 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium [(DMEM), magas glükóztartalmú, 10% újszülött borjú szérum, 2% antimikotikum/ antibiotikum keverék és 0,004% kanamycin, 15% idegi növekedési faktor (NGF)] hozzáadásával végeztük el 12 lyukú steril tenyésztőedényekben. Vizsgálatainkhoz 7 napos szubkonfluens tenyészetet használtunk [190]. A sejtenyészet elkészítéséhez szükséges összes vegyszert a Sigma-Aldrich vállalattól szereztük be.

A primer uterus sejtenyészet egy részét a hetedik napon 18 órán át inkubáltuk fiziológiás koncentrációban (200 pM) az ösztrogén-receptor α (ER α) szelektív 17 β -ösztradiollal [191], illetve szintén 200 pM koncentrációban az ER α -hoz és az ösztrogén-receptor β -hoz (ER β) hasonló affinitással kötődő DES-sel [192]. A kezelt sejteken receptor aktivációs vizsgálatot végeztünk intracelluláris kalciummérés segítségével, majd mérés után a sejteket 15 percig 10%-

os tripszin-EDTA oldattal eltávolítottuk a tenyésztőlemezekről, 700 g-n centrifugáltuk 5 percig, majd 600 µl RNA-Later oldatban vettük fel a génexpressziós vizsgálatok elvégzésének céljából. A felsorolt kísérleti beállításokon kívül DES előkezelt (DES felszabadulás: ~2 µg/nap) és placebo kezelt (méhviasz implantátum aktív hatóanyag nélkül) 4 hónapos nőstény patkányok felhasználásával is készítettünk a fentebb részletezett módon primer uterus sejt kultúrát. Egy hét elteltével a szubkonfluens sejtenyészetet 24 órán át kezeltük 1 µg/µl MIF-el, 330 nM kapszaicinnal illetve 3,3 mM formalinnal, majd valós idejű polimeráz láncreakció (qPCR) segítségével meghatároztuk a TRPA1, TRPV1, indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS) valamint az Il-1β génexpresszióját. A kísérleti paradigmát a 14. ábra szemlélteti.



14. ábra A primer uterus sejtkultúra készítésének lépései, az alkalmazott kezelések és mérőmódszerek ismertetése.

3. mRNS expresszió vizsgálata

Az RNS izolálást RNA-Later-ben tárolt mintákból végeztük 1 ml TRI-reagensben (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA), a gyártó utasításainak megfelelően. Az RNS mennyiségét és tisztaságát Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer V3.5 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) segítségével határoztuk meg. Ezután a mintákat a genomiális DNS eliminálása céljából 1 U DNáz I enzimmel kezeltük 37°C-on 1 órán át. A DNáz I emésztést követően, 1 µg tisztított RNS-ből (kivéve patkány uterus sejtenyészet, ahol 5 ng tisztított RNS átírása történt) cDNS-t szintetizáltunk reverz-transzkripció PCR segítségével (RT-PCR). Patkány endometrium minták esetében RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit-et (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), patkány uterus primer sejt kultúra esetében High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-et (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), humán endometriózis, valamint juh emlő minták vizsgálatához pedig Maxima™ First Strand cDNA Synthesis Kit-et (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) használtunk.

A cDNS mintákból a célgének relatív expresszióját Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) qPCR készülékkel határoztuk meg (11. ábra). A mérést minden esetben 20 µl reakció térfogatban, 20 ng cDNS, 1x Luminaris Color HiGreen Low ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), és 0,3 µM primer koncentráció alkalmazásával hajtottuk végre. A minták mérése minden esetben három technikai ismétlésben történt, referenciagénként patkány endometrium minták és patkány uterus primer sejt kultúra esetében esetében a peptidil-prolil-izomeráz A-t (Ppia), humán endometriózis vizsgálatához riboszomális fehérje L29-et (RPL29), a juh emlő minták analizéséhez pedig β-aktint használtunk. A mérés során végrehajtott disszociációs görbe analízis az amplifikációs reakció specifikusságát igazolta. A génexpresszió mértékét a választott referenciagénekhez viszonyítva a $\Delta\Delta C_t$ módszernek megfelelően számítottuk [193]. A felhasznált primerek teljes listáját, szekvenciáját és NCBI Genebank azonosítóit az 1. táblázat tartalmazza. A qPCR reakció specificitását és a keletkezett termékek méretét minden esetben agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Ehhez 0,01% GelRed-et (Biotum, Harward, CA, USA) tartalmazó 2,5%-os agaróz gél használtunk, markerként Gene Ruler Low Range szolgált (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). A qPCR termékek elektroforézisét 70V-on végeztük 40 percig.

	Gén neve	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	NCBI referencia szekvencia
Patkány	TRPV1	AATACACCATCGCTCTGCT	CAATGTGCAGTGTCTGCG	NM_031982.1
	TRPA1	AGTGGCAATGTGGAGCGATA	TCCCGTCGATCTCAGCAATG	NM_207608.1
	MIF	CACCATGCCTATGTTTCATCGTGAACA	GCCCCGGCTCAAGCGAAGGTGGAACCCGTT	NM_031051.1
	iNOS	CCAAGATGGCCTGGAGGAAC	TGATGCAGTGTACAGCTCC	NM_012611.3
	IL-1β	CCTATGCTTTGCCCGTGGAG	CATCCACGAGTCACAGAGG	NM_031512.2
Humán	Ppia	GCAGACAAAGTCCAAAGACAG	CCATTATGGCGTGTGAAGTC	NM_017101.1
	TRPV1	CAGCTCAATTGCTGTGCAGGTTA	TGCCAGTATGGATGGAGTGGAA	NM_080704.3
	TRPA1	ATGGACAGCTTGGTTACCTCCAC	CAGCACTCTGCTGTTGTATGAA	NM_007332.2
	RPL29	GGCGTTGTGACCCCTATTCC	TGTGTGTGGTGTGGTTCTTGG	NM_000992.2
	PACAP	AAATACTTGGCGGCTGTCCCT	GTACGGTATTCCGCCGTCCTT	NM_001009776.1
Juh	PAC1	ACAGGCTGCTGGGATATGAATG	AGAGTAATGGTGGACAGTTCTG	XM_015095317.1
	BDNF	ACGAGACCA AGTGCAATCCC	GCACGTACGACTGGGTAGTT	XM_004016359.2
	VIP(1)	AGGGACCAATCAAAACGCCAC	GACCTCCTTCGCTGCTTCTC	NM_001126368.1
	VIP(2)	GCGTACTCTTCTCCAGACC	ATTCTGTCCCCCATCCTCAGA	NM_001126368.1
	β-aktin	GCTGTGCTGTCCCTGTACGC	GCGGATGTCCGACGTCACAC	NM_001009784.1

1. táblázat: A génexpressziós vizsgálatok során alkalmazott primerek neve, szekvenciája és NCBI azonosítója. TRPV1: Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1, TRPA1: Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1, MIF: makrofág migrációt gátló faktor, iNOS: indukálható nitrogén-monoxid szintáz, IL-1β: interleukin-1 β, Ppia: peptidil-prolil ciszt-transz izomeráz A, RLP 29: riboszomális fehérje L29, PACAP: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid, PAC1: PACAP receptor, BDNF: brain derived neurotrophic faktor, VIP: vazóaktív intesztinális peptid.

4. Immunhisztokémia

Patkány uterus minták esetében a paraffinba ágyazott szövetmintákból 4 µm vastagságú metszeteket készítettünk, melyeket deparaffinizálás és rehidratálás után pedig antigén feltárás céljából citrát pufferben (pH 6) inkubáltunk mikrohullámú sütőben, 750 W-on 3x5 percig. A szövetek endogén peroxidáz aktivitását 20 perces 3%-os hidrogén-peroxiddal (H₂O₂) történő kezeléssel gátoltuk. A másodlagos antitest nem specifikus kötődésének megakadályozására a mintákat normál kecske szérummal kezeltük 20 percig. Ezután a metszeteket előbb 1:1000-es hígításban nyúl poliklonális anti-TRPV1, (Neuromics, Edina, MN, USA), anti-TRPA1 (Abcam, Cambridge, UK) és anti-MIF (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) antitesttel inkubáltuk 1 órán keresztül, majd másodlagos torna-peroxidázzal konjugált EnVision system anti-nyúl szekunder antitesttel (Dako-Cytomation, Dako North America, USA) 30 percig. A reakciót végül 0,01% hidrogén-peroxidot tartalmazó diamino-benzidin (DAB) oldattal tettük láthatóvá, háttérfestést hematoxilinnel végeztünk [194]. A TRPV1/A1 és MIF immunpozitivitás szemikvantitatív szövettani analízisét független patológus segítségével végeztük. Negatív kontrollként kezeletlen állatok, elsődleges antitest helyett Tris-pufferben inkubált uterus metszete szolgált. Pozitív kontrollként TRPV1-et és TRPA1-et nagy mennyiségben kifejező patkány trigeminális ganglionok szövettani metszetét használtuk. A szövettani metszetekről nagyfelbontású kamerával (Olympus BX51) digitális képeket készítettünk, majd a TRPV1/A1 illetve MIF immunpozitivitást szemikvantitatív pontozási rendszer segítségével (0= nincs pozitivitas, 1= gyenge pozitivitas a sejtek többségén és mérsékelt fokális festődés, 2= mérsékelt pozitivitas a sejtek többségén és erős fokális pozitivitas, 3= erős pozitivitas a sejtek többségén) határoztuk meg. A felhasznált antitestek specifitását blokkoló peptid alkalmazásával, valamint irodalmi adatok alapján verifikáltuk [195].

A humán endometriózis minták immunhisztokémiai vizsgálata során a 4 µm vastagságú metszeteket előbb deparaffinizáltuk, majd rehidratáltuk. Az antigén feltáráshoz a metszeteket EDTA-ban inkubáltuk 98°C-on 30 percig, majd hagytuk szobahőmérsékleten kihűlni [194]. A szövetek endogén peroxidáz aktivitását 20 perces 3%-os hidrogén-peroxidban való inkubációval gátoltuk. A másodlagos antitest nem specifikus kötődésének megakadályozására, a mintákat normál kecske szérummal kezeltük 20 percig, majd az elsődleges antitesttel 4°C-on inkubáltuk egy éjszakán át (TRPV1: GP14100, Neuromics, Edina, MN, USA; TRPA1: ab68847, Abcam, Cambridge, UK). Több mosási lépést követően a metszeteket másodlagos,

torma-peroxidázzal konjugált anti-tengerimalac (TRPV1; Vectastain Guinea Pig ABC IgG HRP Kit, Vectorlabs, Burlingame, CA, USA) és anti-nyúl (TRPA1; EnVision Rabbit HRP Kit, Dako-Cytomation, Dako North America, USA) szekunder antitestekkel inkubáltuk 30 percig. Végül a reakciót 0,01% hidrogén-peroxidot tartalmazó DAB oldattal tettük láthatóvá, háttérfestést hematoxilinnel végeztünk. A TRPV1 és TRPA1 immunpozitivitás mértékét szemikvantitatív szövettani pontozással, a kísérletekben részt nem vevő patológusok segítségével állapítottuk meg. Negatív kontrollként egészséges endometriumszövet szolgált, melyet elsődleges antitest helyett Tris-pufferben inkubáltunk. Pozitív kontrollként TRPV1-et és TRPA1-et nagy mennyiségben kifejező humán mienterikus ganglionok szövettani metszetét használtuk. A szövettani metszetekről nagyfelbontású kamerával (Olympus BX51) digitális képeket készítettünk. A szövettani értékelés során a metszeteket először automata digitális metszet szkennert (Pannoramic Midi II, 3DHistech Kft. Magyarország) segítségével teljes terjedelmükben digitalizáltuk, majd a TRPV1/A1 immunpozitivitást pontozási rendszerrel (0= nincs pozitivitas, 1= gyenge pozitivitas a sejtek többségén és mérsékelt fokális pozitivitas, 2= mérsékelt pozitivitas a sejtek többségén és erős fokális pozitivitas, 3= erős pozitivitas a sejtek többségén) határoztuk meg. Az analízis során 50 egyedi sejt vizsgálatával szövettani pontszám kerül megállapításra (H-pontszám) 0-150 pont terjedelemben. A glanduláris és epiteliális komponensek szeparált analízise során végül metszetenként 100 sejt pontozása történt meg. A felhasznált antitestek szelektivitását blokkoló peptid használatával verifikáltuk.

5. Intracelluláris kalciumionszint mérés fluoereszcens módszerrel

Vizsgálataink során minden kontroll, DES -és progeszteron előkezelt állatból származó, valamint a sejtenyésztes során DES- kezelt primer patkány endometrium sejtenyésztes esetében ugyanazzal a módszerrel történt az intracelluláris fluoereszcens kalciumionszint meghatározása [48]. A sejtenyészteseket 1 μ M fura-2 acetoxi-metilészter (fura-2 AM) fluoereszcens kalcium-indikátor festékkel inkubáltuk 37°C-on 30 percig. Az inkubáló oldat (pH 7,3) összetétele: 122 mM NaCl, 3,3 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 0,4 mM MgSO₄, 1,2 mM KH₂PO₄, 25 mM HEPES, 10 mM glükóz. A mérés a festék kalciumion megkötő képességén alapul. A fura-2 AM az inkubáció során passzív diffúzióval átmegy a sejtmembránon, majd az IC térben specifikus észterázok lehasítják róla az acetoxi-metilészter csoportot, ilyen formában a vegyület alkalmas szabad kalciumionok megkötésére, azonban nem képes átmenni a membránon. A Ca²⁺-t kötött fluoereszcens festék abszorpciós maximuma (340 nm) eltér a Ca²⁺-t nem kötött

formától (380 nm), így a két hullámhosszon való gerjesztést követően az emittált fény intenzitásának hányadosából az intracelluláris Ca^{2+} szint meghatározható. A festékkel töltött endometrium sejteket tartalmazó üveglemezt speciális mérőkádban fluoreszcens mikroszkóp (Olympus BX50WI) tárgyasztalra helyeztük. Ezt követően a sejteket 5 percig extracelluláris oldattal (ECS) mostuk, amely összetétele (pH 7,3): 160 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 2mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 10 mM glükóz. A sejteket a mérés során egy külső perfúziós rendszer segítségével folyamatosan ECS-el perfundáltuk. A mérést szobahőmérsékleten végeztük, a fluoreszcens képet 20x-os nagyítású vízimmerziós objektív (Olympus LUMPLAN FI/x20 0.5 W) és digitális kamera (CCD: SensiCam PCO) segítségével rögzítettük. A sejtek által felvett fura-2 AM 340 és 380 nm hullámhosszúságú fénnel való alternáló gerjesztését kettős monokromátor berendezés biztosította (Polychrome II, Till Photonics). Az emittált fényt 510 nm-en detektáltuk interferenciaszűrő és fotoelektron sokszorozó segítségével. A két hullámhosszon gerjesztett fluoreszcencia intenzitás egymáshoz viszonyított arányát megadó ún. rációmetrikus értéket ($R = F_{340}/F_{380}$) az idő függvényében Axon Imaging Workbench 2.2 szoftverrel határoztuk meg. Az eredmények értékelését a Microcal Origin 7.0. (Originlab Corp. Northhampton, USA) szoftverrel végeztük. A sejtmentes területekről nyert adatok felhasználásával háttérlevonást végeztünk, a sejtekben az ECS perfúzió alatt detektálható rációmetrikus értéket tekintettük $R=0$ értéknek, amelyhez a tesztoldatok adása folyamán mért R értékeket viszonyítottuk. A TRPV1 és TRPA1 receptor tesztelése során a mérést 5 percig végeztük. A TRPV1 esetében 330 nM kapszaicinnal, a TRPA1 esetében pedig 3,3 mM formalin adásával váltottunk ki receptor aktivációt. A sejtek életképességét 50 mM KCl oldat áramoltatásával ellenőriztük.

6. PACAP radioimmunoassay (RIA)

A PACAP38- IR meghatározását plazmában és emlőmintákban PACAP38 specifikus, szenzitív radioimmunassay (RIA) módszerrel végeztük, a peptid koncentrációját standard kalibrációs görbe segítségével számítottuk [18,196]. A „ab 35342” PACAP38 antiszérumot (Abcam, Cambridge, UK) juhok immunizálásával, szintetikus peptid segítségével állították elő, amely a PACAP 14 aminosav hosszúságú C-terminális fragmensére specifikus. A RIA standard előállításához 8-2000 fmol/ ml koncentrációban szintetikus PACAP peptidet használtunk. Szövethomogenizáló segítségével (MICCRA D-15) az emlőmintákból 280 mg-ot

homogenizáltunk 2 ml desztillált vízben, amelyhez proteáz inhibitorot adtunk (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Homogenizálás után a mintákat 4°C-on centrifugáltuk 600 g fordulatszámon, 15 percig. Ezt követően a felülúszót hideg csövekbe gyűjtöttük, majd 4°C-on 10000 g-n centrifugáltuk 15 percig. A polipropilén RIA csövekbe (Merck, Darmstadt, Németország) duplikátumban vagy standardot (100 µl), vagy ismeretlen mintát (50 µl) mértünk, emellett 100 µl antiszérumot (hígítás: 1:7500), 100 µl ¹²⁵I izotóppal jelölt antigént (3000 cpm/cső), majd az inkubációs elegyet 750 µl RIA pufferrel [0,05 mol/l (pH 7,4) foszfát puffer, amely 0,1 mol/l NaCl-ot, 0,25 % (w/v) BSA-t és 0,05 % (w/v) NaN₃-t tartalmaz] 1 ml térfogatra egészítettük ki. A vér PACAP38 tartalmának megállapításához 2 ml plazmát abszolút alkohol és 96%-os ecetsav keverékével inkubáltunk szobahőmérsékleten 30 percig, majd az elegyet 4°C-on 950 g-n centrifugáltuk 20 percig. A felülúszókat reakciócsövekbe gyűjtöttük és áramló nitrogén alatt szárítottuk 6 órán át. A szárított mintát 1 ml RIA pufferben vettük fel, majd az elegyet 10000 g-n 15 percig centrifugáltuk. A tejminták esetében 1 ml tejhez 10 µl 96%-os ecetsavat adtunk, majd 40°C-os vízfürdőben inkubáltuk 5 percen keresztül. Ezt követően a csöveket 4°C-on, 960 g-n 20 percig centrifugáltuk úgy, hogy a cső felső részén homogén zsírréteget, középen vizes fázist (savó) és alul kicsapódott fehérje frakciót nyerjünk. A leszívott savót ismét 4°C-on, 10000 g-n centrifugáltuk, majd a felülúszóhoz 1 ml RIA puffert adtunk.

A RIA pufferrel kiegészített mintákat 48-72 órán át inkubáltuk 4°C-on. Ezután az antitesthez kötött jelölt antigén frakciót 100 µl szeparáló oldattal (10 g mosott szén/Norit A, Serva), 1 g dextránt (Serva, molekulásúly: 50000-75000 Da) választottuk el, majd 0,5 g zsírmentes tejport és 100 ml desztillált vizet mértünk az elegyhez. A mintákat 4°C-on, 20 percen át 950 g-n centrifugáltuk, majd a felülúszót leöntöttük. A szénhez kötött szabad peptidfrakció radioaktivitását NZ310 típusú gamma számlálóval határoztuk. Az ellenanyaghoz kötött radioaktivitás értékek alapján a kalibrációs görbe segítségével állapítottuk meg az ismeretlen mintához tartozó PACAP38- IR-t.

7. VIP kimutatása enzimmel kötött immunszorbens módszer segítségével (ELISA)

A VIP koncentráció mértékét bárányok plazmájában a szopással összefüggésben illetve anyajuhok plazma és tejmintáiban specifikus ELISA módszer segítségével határoztuk meg gyártó utasításainak megfelelően (Sincere™, Sincere Co., Beijing, Kína). Az alkalmazott kit

detektálási tartománya 7,8- 500 pg/ml, az esszé érzékenysége <2,0 pg/ml. A plazma és tejmintákat 4 °C-on, 950 g fordulatszámon centrifugáltuk 10 percig, majd a felülúszóból végeztük az ELISA mérést. Két technikai ismételtsben 10-10 µl plazma illetve tejsavó vagy standardot mértünk a lemezre, melyet ezután 90 percig szobahőmérsékleten inkubáltunk. Az inkubálás után a lemezt háromszor mostuk 350 µl mosóoldattal, ezt követően 100 µl biotinlált anti-juh VIP antitestet mértünk a lemezre (hígítás: 1:100), majd újabb inkubáció következett szobahőmérsékleten 60 percen át. Az inkubáció életeltével többszöri mosási lépéseket követően a lemezre mértünk 100 µl avidin-biotin-peroxidázt (kit tartozéka) majd 30 perces inkubáció következett fél órán át. A színreakciót 100 µl "TMB Color Developing Reagent" hozzáadásával váltottuk ki, a lemezt eközben fénytől védett helyen tároltuk. A reakciót fél óra elteltével „TMB Stop Solution” segítségével állítottuk le, majd a 450 nm-hez tartozó optikai denzitást Multiskan RC microplate reader (Labsystems, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével határoztuk meg (a referencia hullámhossz 630 nm volt). Az egyes minták VIP koncentrációját a standard hígítási sor alapján készített kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg.

8. Statisztikai analízis

Az eredményeket $\bar{x} \pm s$ az átlag szórása (SEM) formában fejeztük ki. A mért adatok statisztikai eloszlását előzetesen minden esetben Kolmogorov-Smirnov normalitás tesztel állapítottuk meg. Amennyiben az adatsor eloszlása eltért a normál elosztásról, úgy a vizsgálati csoportok kontroll csoporthoz történő összehasonlításakor Mann-Whitney U-tesztet (humán endometriózis minták és juh emlő minták qPCR analízise és juh emlő minták PACAP38-IR meghatározása, endometriózisos betegek demográfiai és fájdalomparamétereinek analízise), a csoportok egymáshoz való hasonlításakor pedig Kruskal-Wallis többszörös összehasonlító próbát (Dunn poszt teszt: hormonkezelt patkányminták szemikvantitatív szövettani értékelése) végeztünk.

Normál eloszlás esetében, a vizsgálati csoportok kontroll csoporthoz történő összehasonlításakor a statisztikai vizsgálatot Student t-tesztel (endometriózisos betegek demográfiai analízise), többszörös összehasonlítás során egyutas ANOVA-val, majd Dunnett post-hoc tesztel (hormonkezelt patkányminták és primer uterus sejt kultúrák qPCR analízise, juh tej- és vérminták PACAP38-IR és VIP koncentrációja), illetve Bonferroni összehasonlítással (endometriózis szövettani metszetek szövettani pontozása) végeztük.

A klinikai paraméterek súlyossága és a DIE szövettani eredmények immunpozitivitása között fennálló statisztikai korreláció megállapítását normál eloszlás esetében Pearson (r_p) (DM és dyschezia) illetve Spearman teszttel (r_s) (dysuria, dyspareunia, irritábilis bél szindróma, intersticiális cisztitisz) határoztuk meg.

Az adatok ábrázolását és statisztikai kiértékelését Graph Pad™ Prism 5.0 program segítségével végeztük. Minden esetben $p < 0,05$ értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

IV. EREDMÉNYEK

1. A TRPA1 és TRPV1 ioncsatornák, valamint a MIF jelenléte és ösztrogén kezelés hatására bekövetkező expresszió-változása patkány endometriumban

1.1.1. A TRPA1/V1 és MIF mRNS expresszió fokozódása DES előkezelés hatására

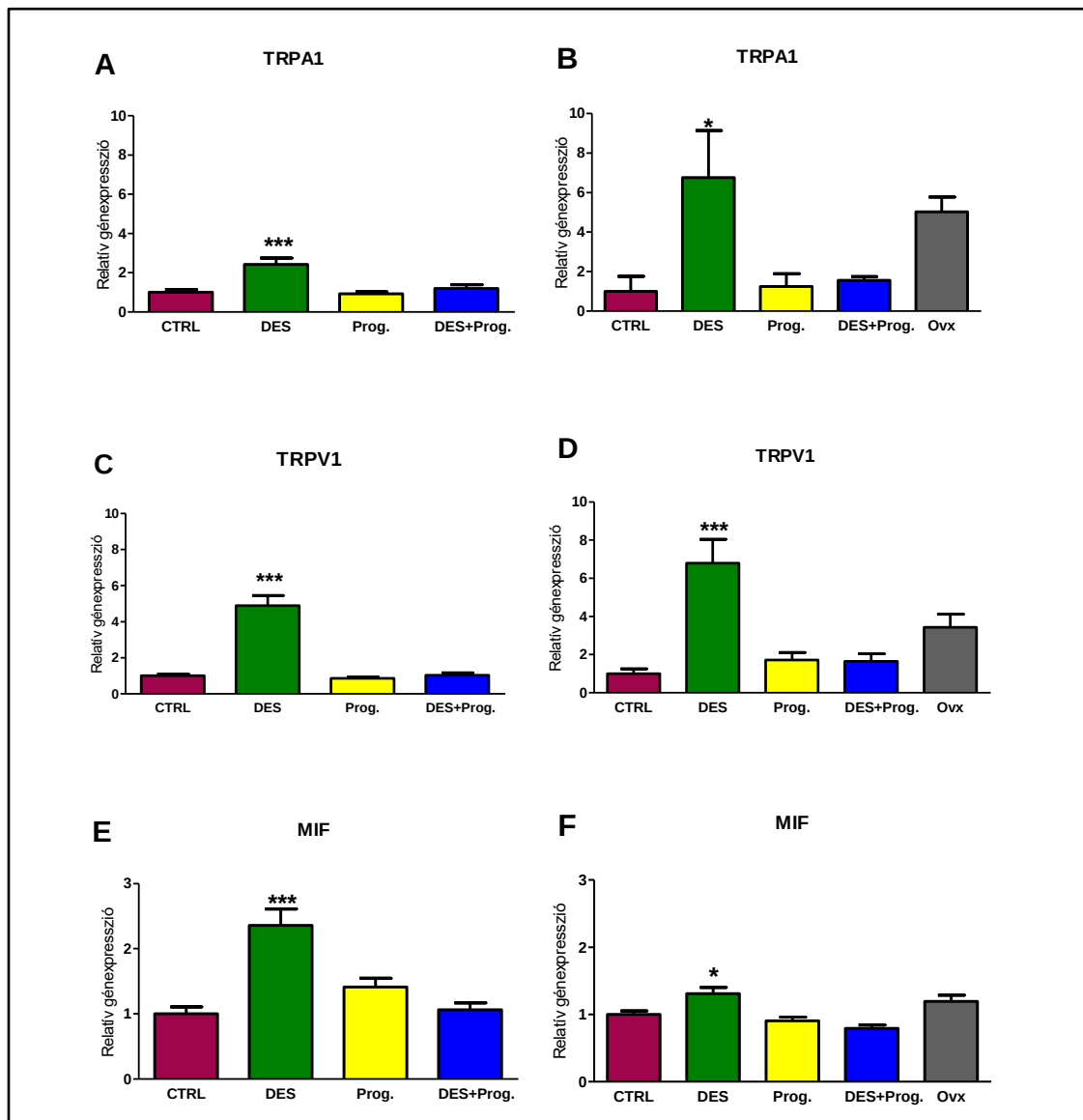
A vizsgálataink tárgyát képező TRP receptorok, valamint a MIF génexpressziójának meghatározását qPCR módszer segítségével végeztük el, mRNS expressziójuk mértékét a Ppia referenciagénhez viszonyítottuk. A választott referenciagént stabil, életkortól és hormonális állapottól független kifejeződés jellemzi, amely lehetővé tette vizsgálataink során történő felhasználását [197] (1. függelék).

A TRPA1 receptor esetében DES kezelés hatására szignifikáns, 2,5-szeres génexpresszió-emelkedést mértünk ivaréretlen (15/A ábra), és 8-szoros fokozódást ivaréretlen patkányok endometriumban (15/B ábra). A progeszteronkezelés önmagában nem volt hatással a TRPA1 expresszióra, sőt DES-sel kombinált alkalmazását követően a DES expressziót fokozó hatás elmaradását tapasztaltuk (15/A, B ábra). Ovariektómia után enyhe mRNS növekedés tapasztalható, ez azonban nem éri a statisztikailag szignifikáns értéket (15/B ábra), emellett álműtött egyedeknél sem tapasztaltunk változást (génexpresszió mértéke: 1,21).

A TRPA1-hez hasonlóan, a TRPV1 receptor esetében is markáns, 5-szörös expresszió-fokozódást tapasztaltunk ivaréretlen (15/C ábra), és ~ 6,8-7-szeres emelkedést ivarérett patkányok endometriumban (15/D ábra). Progeszteronkezelést követően a TRPV1 expresszióban nem detektáltunk a kontrolltól eltérő változást. DES-sel kombinálva ez esetben is elmaradt az ösztrogén analóg vegyület hatására bekövetkező génexpresszió emelkedés. A TRPA1 esetében tapasztaltakkal azonos módon sem az ovariektomizált, sem az álműtött csoportban nem mértünk szignifikáns TRPV1expresszió-növekedést (génexpresszió mértéke álműtött egyedekben: 1,09).

A MIF esetében DES kezelés hatására kismértékű, ám szignifikáns génexpresszió-fokozódást mértünk, amely ivaréretlen patkányok esetében 2,5-szeres, ivarérettekben 1,5-szörös volt (15/E, F ábra). Progeszteronnal kombinált adás esetén ez a növekedés a MIF esetében is elmaradt. A

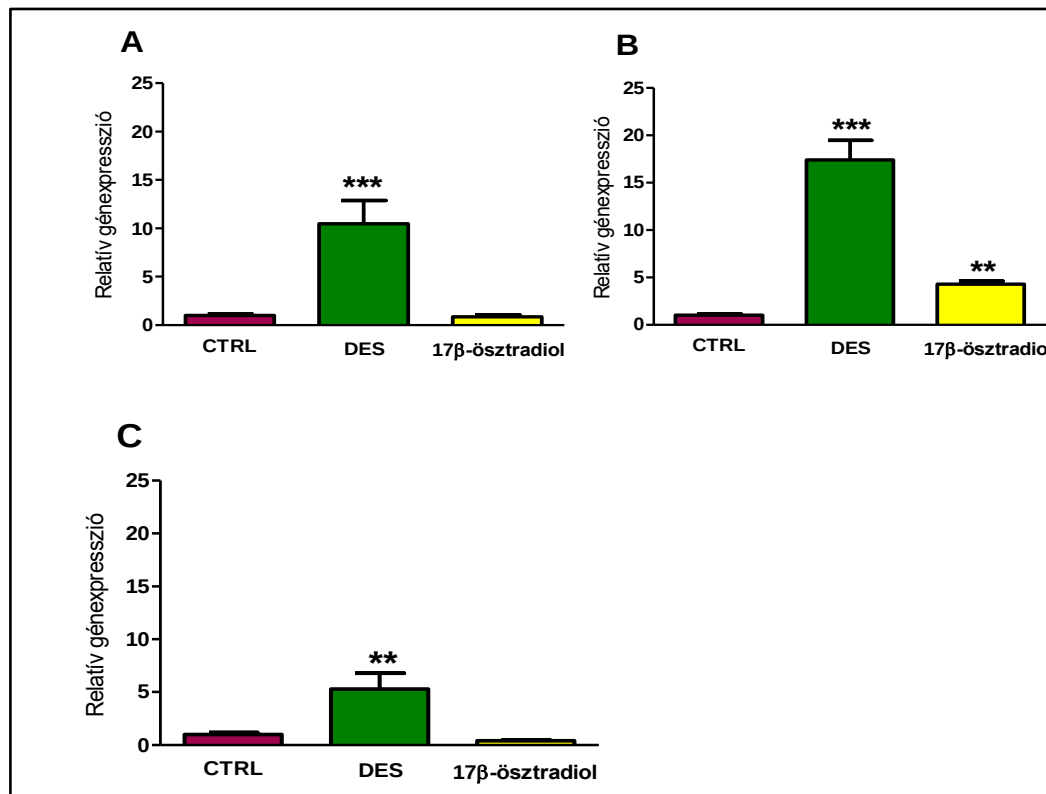
progeszteron kezelés önmagában illetve az ovariectomia nem okozott expresszió növekedést. Az álműtött csoport génexpressziójának mértéke:1,19.



15. ábra: A TRPA1 (A, B), TRPV1 (C, D) receptorok, valamint a MIF (E, F) gének relatív expressziója hormonkezelt fiatal (A, C, E) és felnőtt (B, D, F) patkányok endometrium mintáiban (n=5/ csoport). Az oszlopok a peptidil-prolil izomeráz-A (Ppia) génhez viszonyított génexpressziós értékeket reprezentálják (átlag±SEM), amelyet $\Delta\Delta C_t$ módszerrel határoztunk meg. Statisztika: Egyutas ANOVA, Dunnett post-hoc teszt: *p < 0,05, *p < 0,0001. CTRL: kontroll, DES: dietilstilbösztrol, Prog.: progeszteron, OvX: ovariectomizált.**

1.2. A TRPA1/V1 és MIF génexpressziójának változása *in vitro* DES kezelés hatására endometrium sejt kultúrában

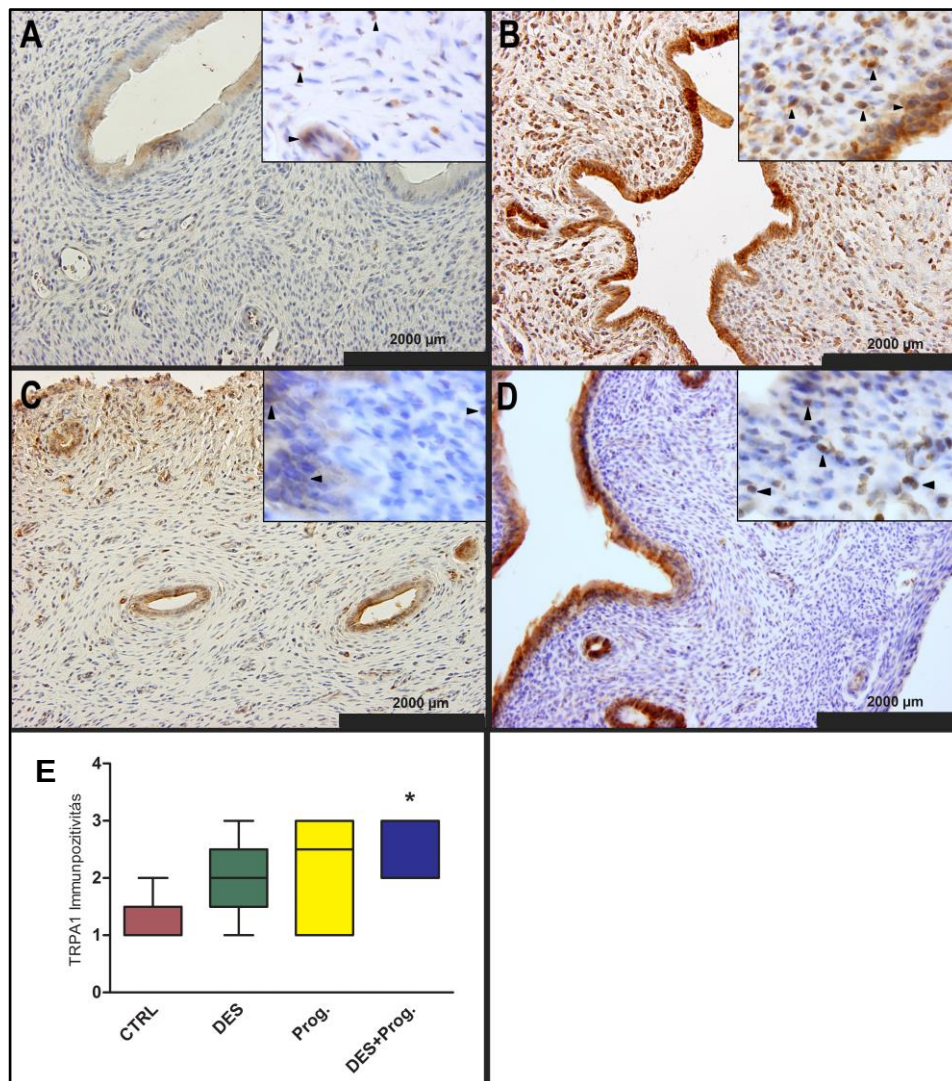
A primer endometrium sejt kultúrát 18 órán át inkubáltuk 200 pM DES-sel, melynek végén a sejtekből RNS-t izoláltuk, majd qPCR módszerrel meghatároztuk a TRPA1, TRPV1 és MIF gének expresszióját. A DES inkubáció hatására a TRPA1 receptor mRNS mennyisége 10-szeresére, a TRPV1 receptoré 17-szeresére, a MIF-é pedig 5-szörösére emelkedett a sejtekben (16. ábra). A szintén 200pM koncentrációjú 18 órás ER α - szelektív 17 β -ösztadiol előkezelést követően a TRPA1 receptor és a MIF esetében nem detektáltunk génexpresszió-változást (16/A, C ábra), míg a TRPV1 mRNS mennyisége 5-szörösére emelkedett a sejtekben (16/B ábra).



16. ábra: A TRPA1 (A), TRPV1 (B) receptorok, valamint a MIF (C) gének relatív expressziója 18 órás DES- valamint 17 β -ösztadiol kezelés után, patkány primer endometrium sejt kultúrában (n=4/ csoport). Az oszlopok a peptidil-prolil izomeráz-A (Ppia) génhez viszonyított génexpressziós értékeket reprezentálják (átlag $\pm$ SEM), amelyet $\Delta\Delta$ Ct módszerrel határoztunk meg. Statisztika: Egyutas ANOVA, Dunnett post-hoc teszt: **p<0,005, ***p<0,0001. CTRL: kontroll, DES: dietilstilbösztrol.

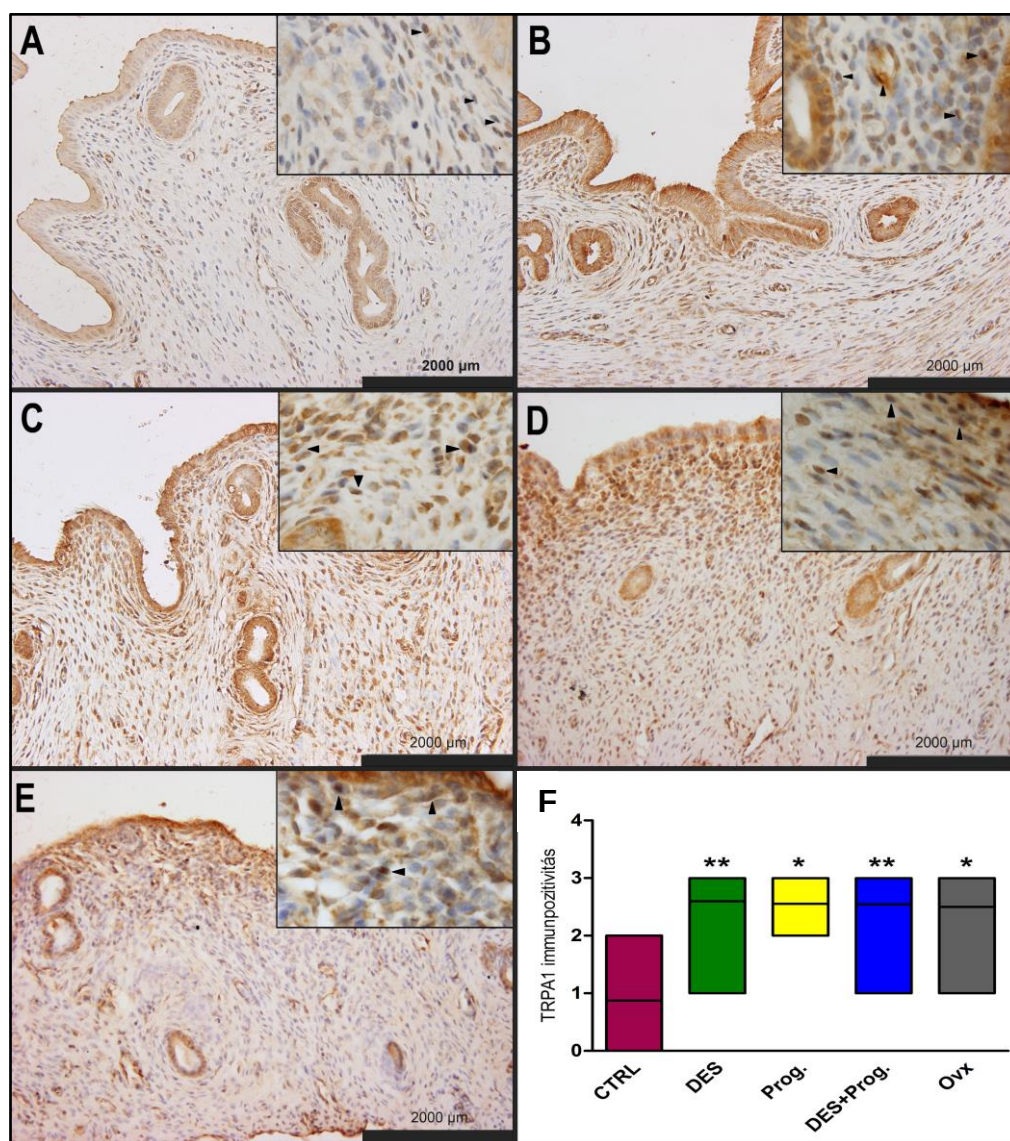
1.3. A TRPA1/V1 és MIF fehérje lokalizációja és hormonfüggő növekedése patkány endometriumban

Kezeletlen 4 hetes állatokban minimális TRPA1 immunpozitivitás detektálható az epitél rétegben (17/A ábra). Ez a kismértékű pozitivitás DES-kezelt állatokban (17/B ábra) emelkedést mutat, a statisztikailag szignifikáns mértéket azonban progeszteronnal kombináltan éri el (17/D ábra). A progeszteron kezelés önmagában nem befolyásolja a TRPA1 fehérje expresszióját (17/C).



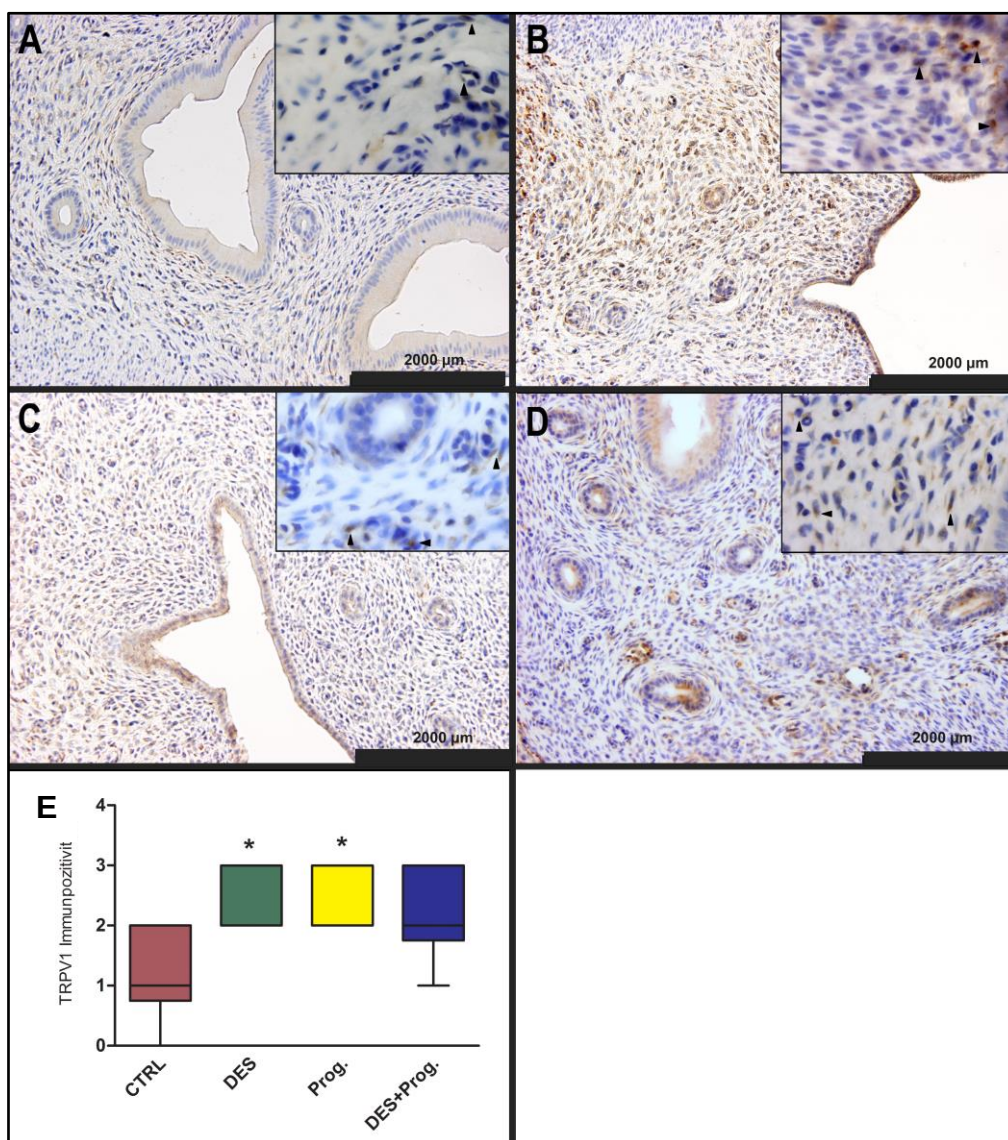
17. ábra: A TRPA1 receptor fehérje lokalizációja ivaréretlen patkányok uterus mintáiban. Kezeletlen (A), DES-kezelt (B), progeszteron kezelt (C), DES+progeszteron kezelt (D), szemikvantitatív értékelés (E). A TRPA1 immunpozitivitás mértékét (D) szemikvantitatív pontozási rendszerrel állapítottuk meg (n=3 metszet/ állat; n= 5 állat/csoport). Az értékelés során adott pontszámokat a medián és az interkvartilis terjedelem (25-75 percentilis) ábrázolásával adtuk meg. Nagyítás mértéke: 200x, inzertek: 400x. Statisztika: Kruskall-Wallis teszt, Dunn's poszt teszt, $p<0,05$.

Intakt 4 hónapos patkányok esetében gyenge/mérsékelt TRPA1 fehérje expressziót detektáltunk, amely főként az epitél rétegre illetve a mirigyek területére lokalizálódott. míg a sztrómális sejtek esetében elszórt jelölődés volt megfigyelhető a felszínhez közeli területeken (18/A ábra). A DES- (18/B ábra), progeszteron (18/C ábra) és a kombinált kezelés (18/D ábra), valamint az ovariectómia (18/E ábra) is szignifikáns expresszió-fokozódást eredményezett az epitéliumban és a mirigyek környékén (18/F ábra).



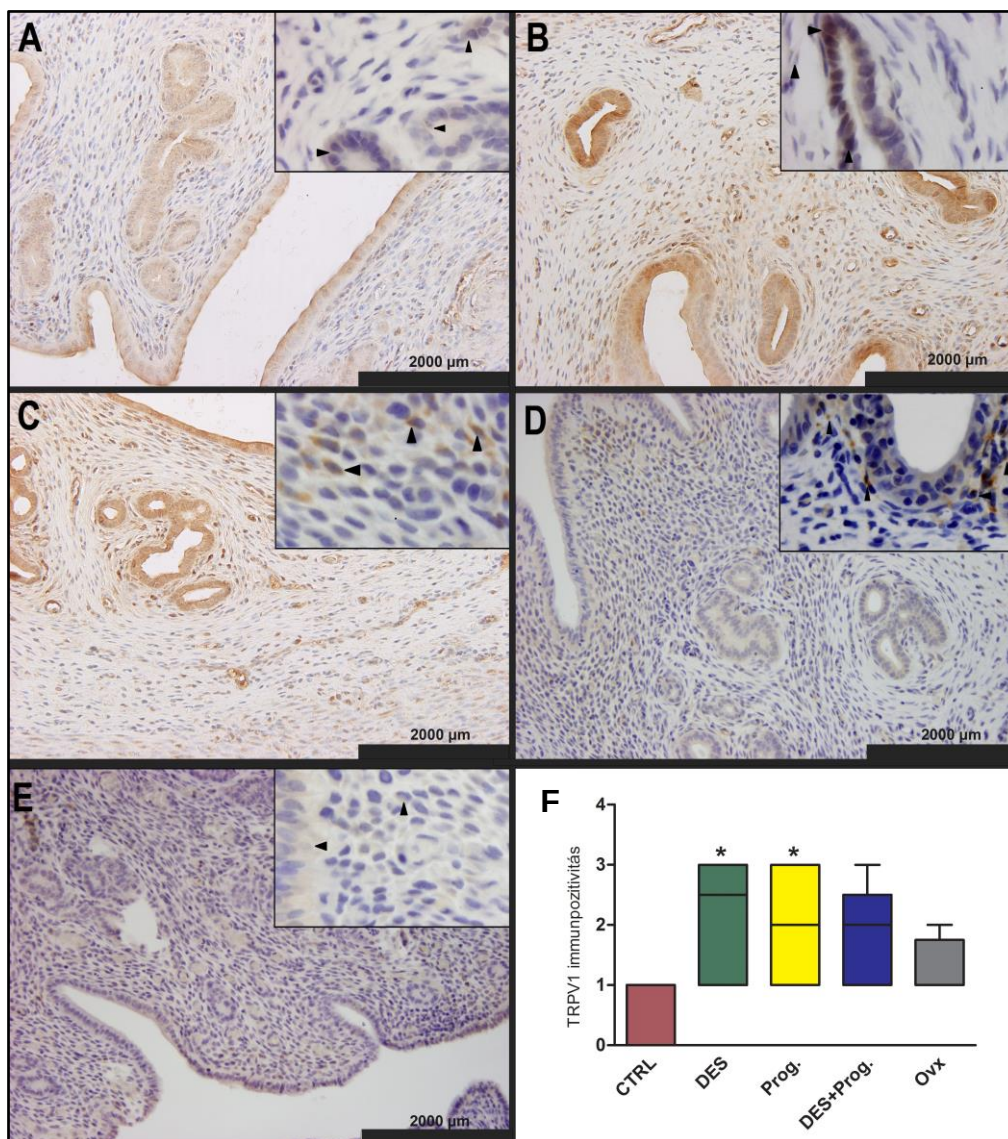
18. ábra: A TRPA1 receptor fehérje lokalizációja ivarérett patkányok uterus mintáiban. Kezeletlen (A), DES-kezelt (B) progeszteron kezelt (C), DES+progeszteron kezelt (D) és ovariectomizált (E), szemikvantitatív értékelés (F) (n=3 metszet/ állat; n=5 állat/csoport). Az értékelés során adott pontszámokat a medián és az interkvartilis terjedelem (25-75 percentilis) ábrázolásával adtuk meg. Nagyítás mértéke: 200x, inzertek: 400x. Statisztika: Kruskal-Wallis teszt, Dunn's poszt teszt, $p < 0,05$, $**p < 0,005$.

Ivaréretlen állatokban esetében a TRPV1 immunpozitivitás mértéke szignifikánsan megemelkedett DES-kezelés után a sztrómában és a mirigyekben (19/B ábra), emellett a progeszteronkezelés is szignifikáns expresszió-fokozódást eredményezett (19/C ábra). DES-sel kombinálva szignifikáns változást nem tapasztaltunk (19/D ábra).



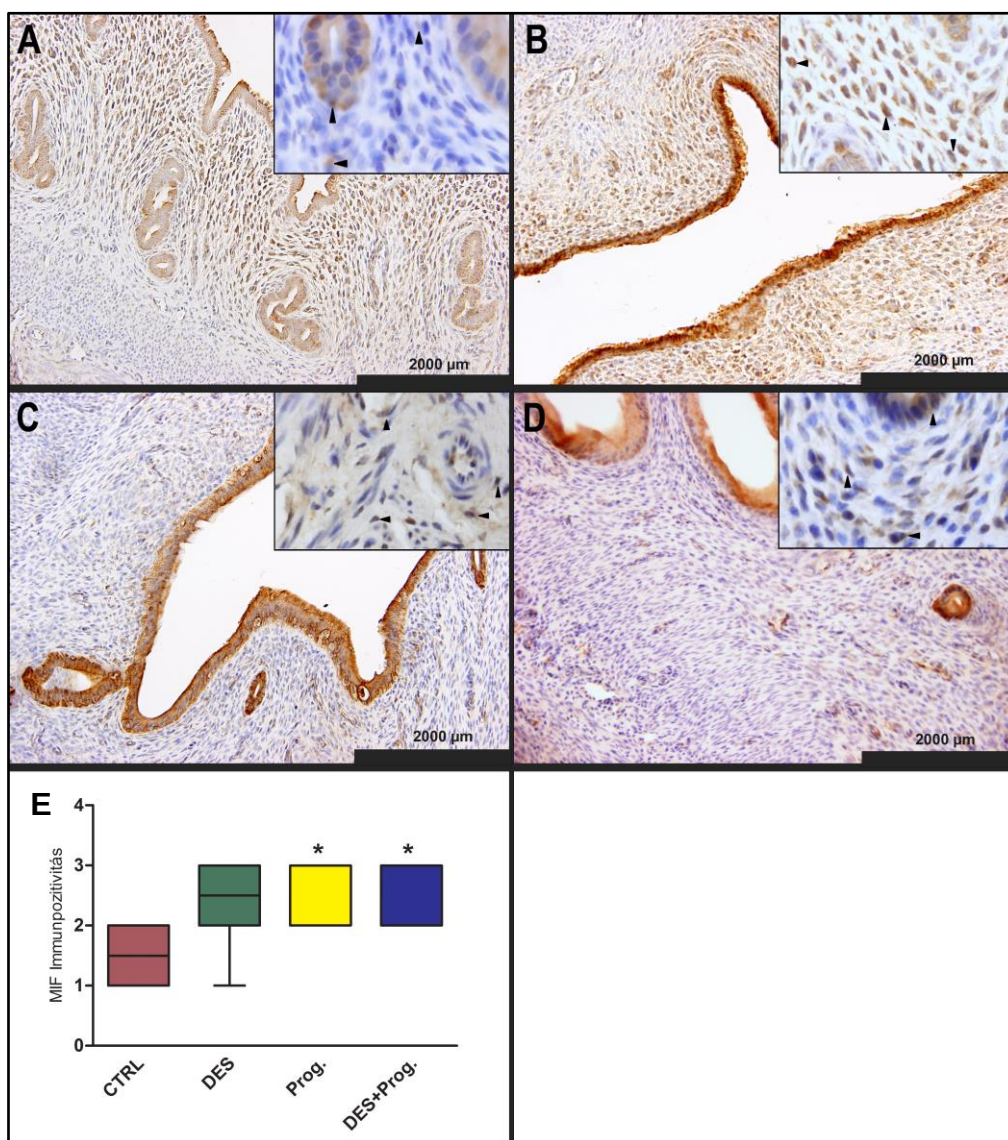
19. ábra: A TRPV1 receptor fehérje lokalizációja ivaréretlen patkányok uterus mintáiban. Kezeletlen (A), DES-kezelt (B), progeszteron kezelt (C), DES+progeszteron kezelt (D), szemikvantitatív értékelés (E). A TRPA1 immunpozitivitás mértékét (D) szemikvantitatív pontozási rendszerrel állapítottuk meg (n=3 metszet/ állat; n= 5 állat/csoport). A Az értékelés során adott pontszámokat a medián és az interkvartilis terjedelem (25-75 percentilis) ábrázolásával adtuk meg. Nagyítás mértéke: 200x, inzertek: 400x . Statisztika: Kruskal-Wallis teszt, Dunn's poszt teszt, $p < 0,05$.

A TRPV1 receptor tekintetében, a 4 hónapos patkányokban gyenge immunpozitivitást detektáltunk elsődlegesen a sztrómában és a mirigyek közelében a kontroll csoportban (20/A ábra). A DES-, valamint a progeszteron kezelés önmagában fokozta a TRPV1 expresszióját (20/B, C ábra), kombinációban adva a szignifikáns emelkedést azonban nem mértünk (20/D ábra). Az ovariectómia nem volt hatással a TRPV1 fehérje mennyiségére (20/E ábra).



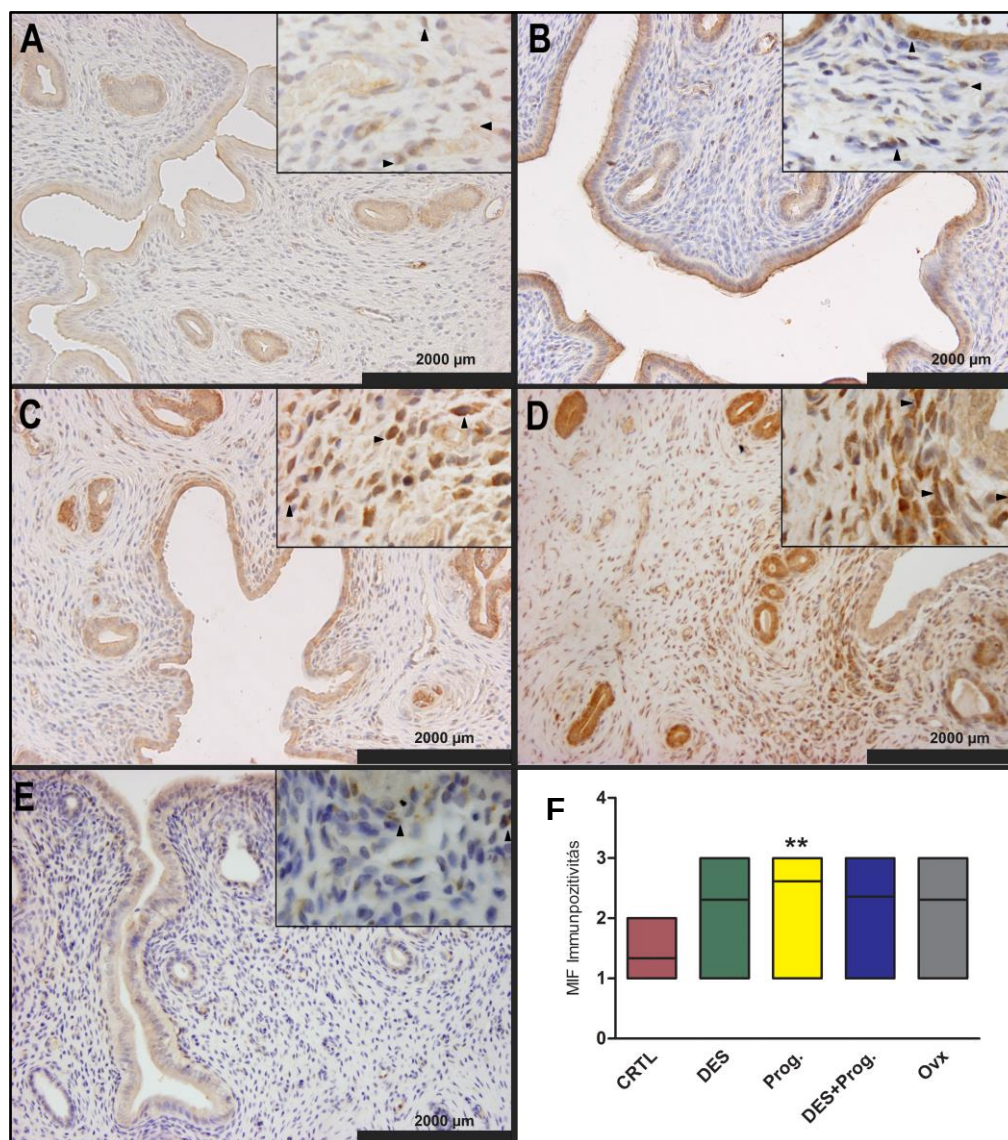
20. ábra: A TRPV1 receptor fehérje lokalizációja ivarérett patkányok uterus mintáiban. Kezeletlen (A), DES-kezelt (B), progeszteron kezelt (C), DES+progeszteron kezelt (D) és ovariectomizált (E), szemikvantitatív értékelés (F) (n=3 metszet/ állat; n=5 állat/csoport). Az értékelés során adott pontszámokat a medián és az interkvartilis terjedelem (25-75 percentilis) ábrázolásával adtuk meg. Nagyítás mértéke: 200x, inzertek: 400x. Statisztika: Kruskal-Wallis teszt, Dunn's poszt teszt, $p < 0,05$.

Ivaréretlen egyedek esetében, kontroll állatokban moderált immunpozitivitást figyeltünk meg (21/A ábra). DES kezelés hatására emelkedett MIF expressziót detektáltunk az epitél rétegben és a környező sztrómában is (21/B ábra). A statisztikailag szignifikáns értéket progeszteron (21/C ábra) és kombinált kezelést követően detektáltuk (21/D ábra).



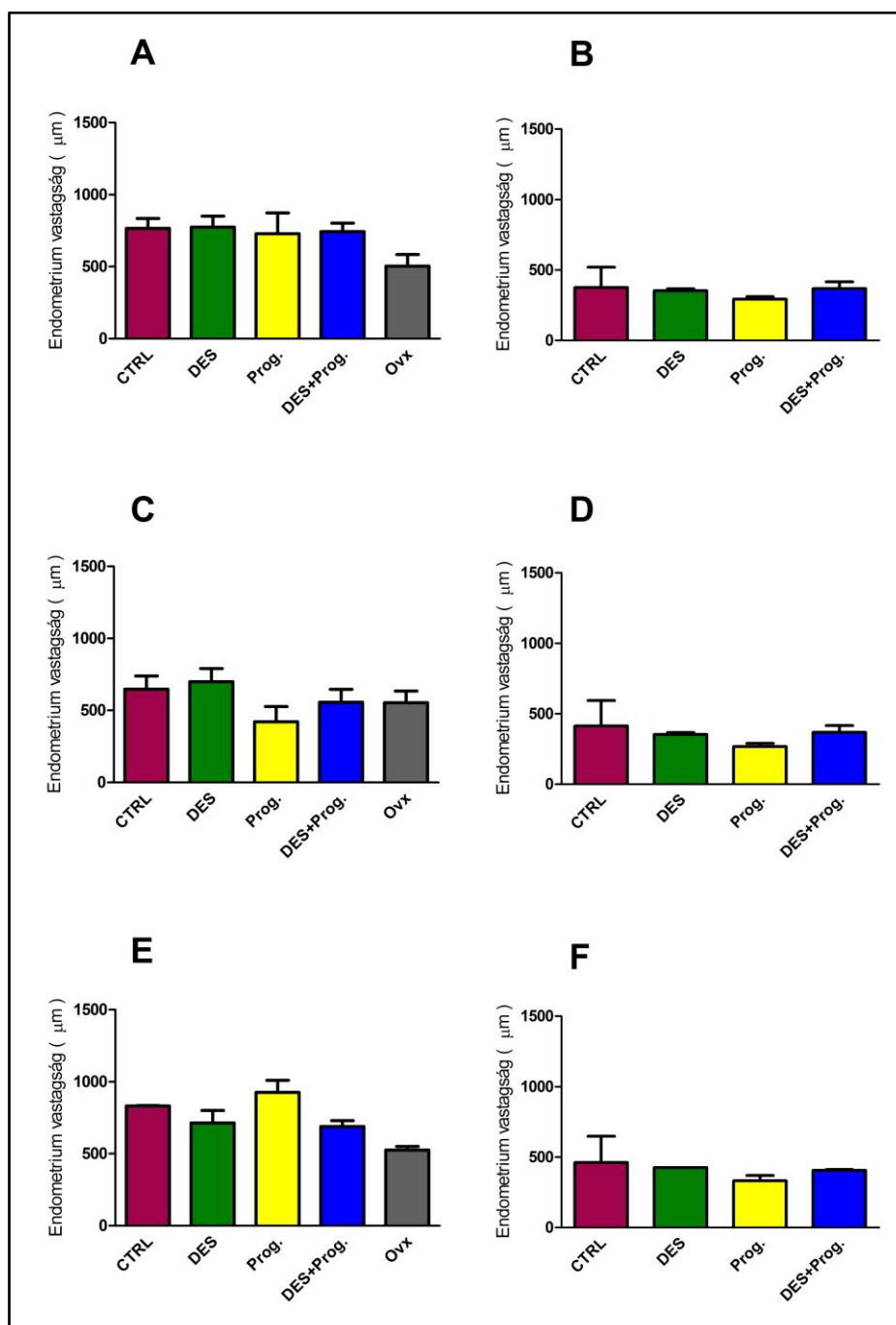
21. ábra: A MIF lokalizációja ivaréretlen patkányok uterus mintáiban. Kezeletlen (A), DES-kezelt (B), progeszteron kezelt (C), DES+progeszteron kezelt (D), szemikvantitatív értékelés (E). A TRPA1 immunpozitivitás mértékét (D) szemikvantitatív pontozási rendszerrel állapítottuk meg (n=3 metszet/ állat; n=5 állat/csoport). A Az értékelés során adott pontszámokat a medián és az interkvartilis terjedelem (25-75 percentilis) ábrázolásával adtuk meg. Nagyítás mértéke: 200x, inzertek: 400x . Statisztika: Kruskal-Wallis teszt, Dunn's poszt teszt, $p < 0,05$.

Ivarérett állatokban, MIF immunreaktivitás tekintetében moderált immunpozitivitást detektáltunk a kontroll csoportban (22/A ábra). DES- illetve progeszteron-kezelést követően kismértékű expressziófokozódást tapasztaltunk az epitéliumban valamint a sztrómában (22/B, C ábra). Statisztikailag szignifikáns fokozódást a progeszteron kezelés hatására mértünk, amely a fokális epitélrétegre koncentrált (22/C, F ábra).



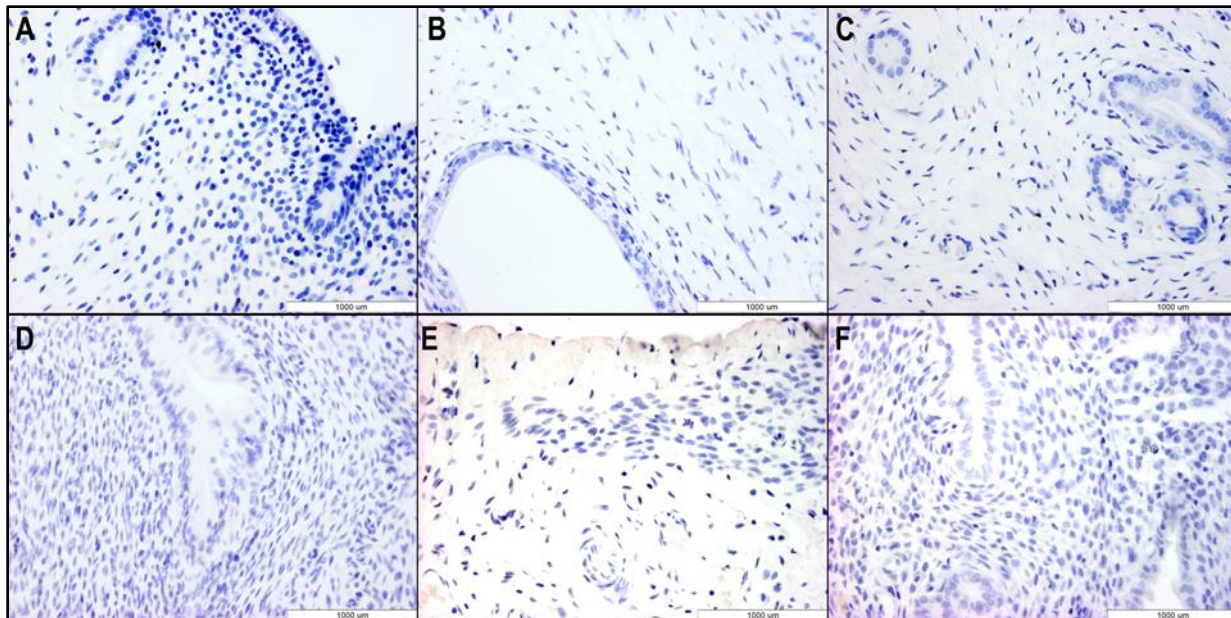
22. ábra: A MIF lokalizációja ivarérett patkányok uterus mintáiban. Kezeletlen (A), DES-kezelt (B), progeszteron kezelt (C), DES+progeszteron kezelt (D) és ovariectomizált (E), szemikvantitatív értékelés (F) (n=3 metszet/ állat; n=5 állat/csoport). Az értékelés során adott pontszámokat a medián és az interkvartilis terjedelem (25-75 percentilis) ábrázolásával adtuk meg. Nagyítás mértéke: 200x, inzertek: 400x. Statisztika: Kruskal-Wallis teszt, Dunn's poszt teszt, $p < 0,05$.

A kísérleti 4 hetes és 4 hónapos állatcsoportok endometriumának vastagságát okulármikrométer segítségével határoztuk meg, a mérés adatait a 23. ábra tartalmazza. Az alkalmazott kezelések egyike sem okozott szignifikáns változást az endometrium vastagságában, sem ivaréretlen, sem ivarérett állatok tekintetében (23. ábra).



23. ábra: Az endometrium vastagságának alakulása 4 hónapos (A, C, E) és 4 hetes (B, D, F) patkányokban (n=3 metszet/ állat; n=5 állat/csoport). TRPA1 immunfestés: A, B; TRPV1: C, D; MIF: E, F. DES: dietilstilbösztrol, PROG: progeszteron, Ovx: ovariectomia. Statisztika: Egyutas ANOVA, Bonferroni post teszt.

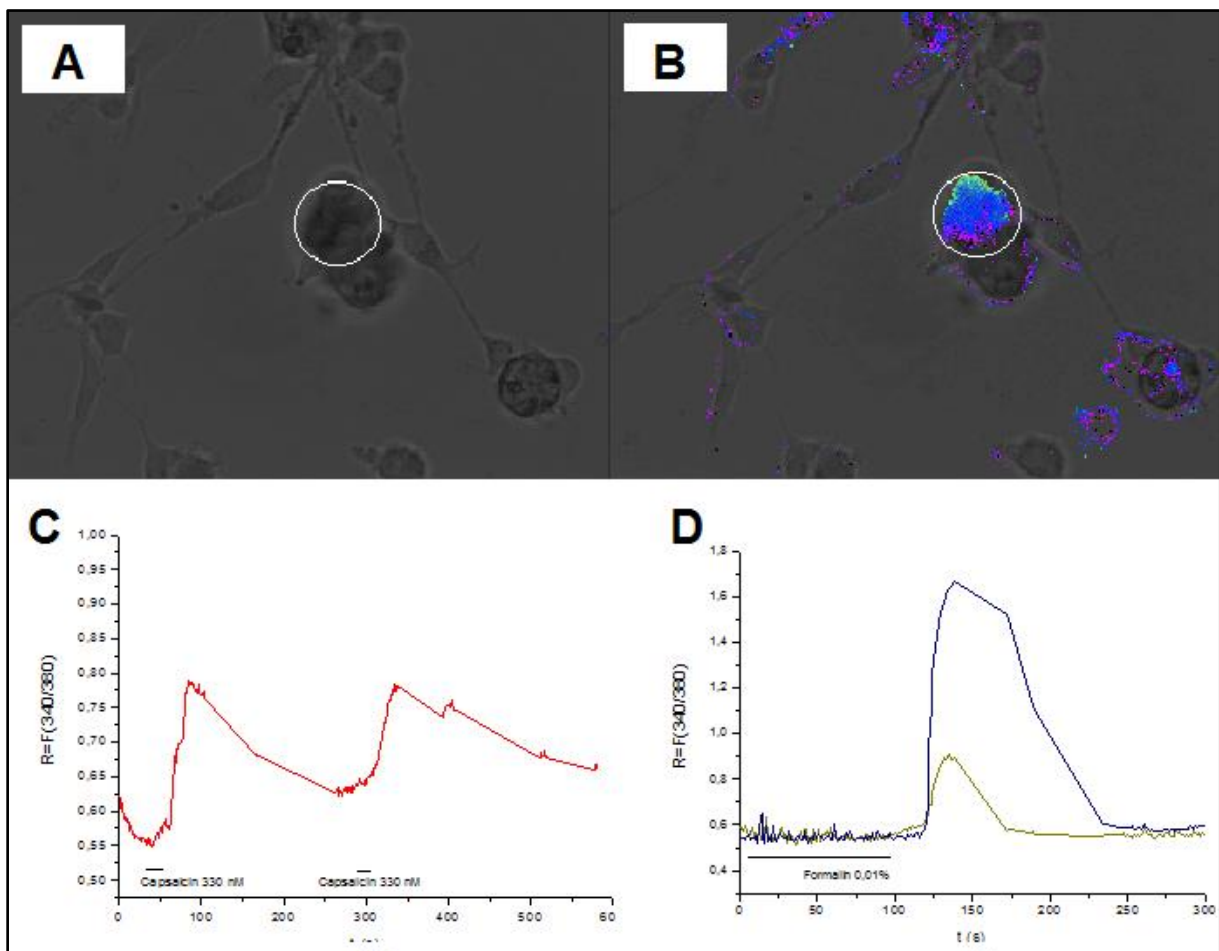
Az elvégzett immunhisztokémiai jelölések elsődleges antitesttel nem kezelt, negatív kontrollként szolgáló metszeteinek mikroszkópos képeit a 24. ábra szemlélteti.



24. ábra: A TRPA1 (A, D), TRPV1 (B, E) és MIF (C, F) specifikus immunhisztokémia negatív kontroll metszetei 4 hónapos (A, B, C) és 4 hetes (D, E, F) patkányok esetében.

1.3.1. A TRPA1/V1 funkcionális vizsgálata patkány primer uterus sejt kultúrában

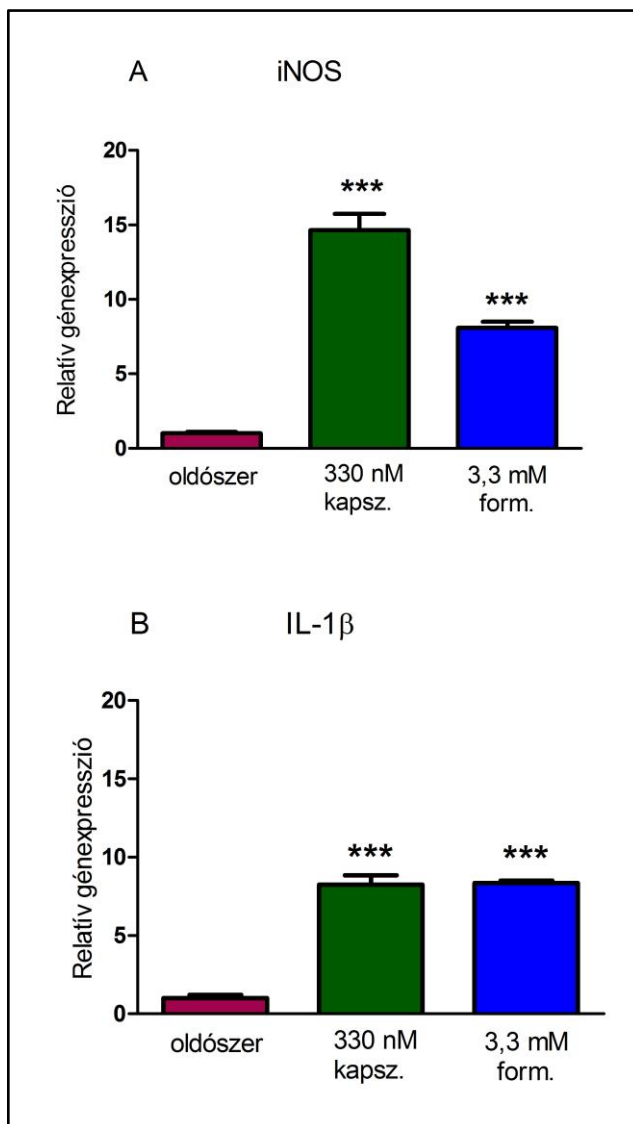
Mind a TRPA1 agonista formalin (3,3 mM), mind pedig a TRPV1 aktivátor kapszaicin (330 nM) Ca^{2+} -beáramlást eredményezett az endometrium sejtekbe, amely bizonyítja, hogy a sejtek felszínén funkcionális receptorok találhatók (kapszaicinnel aktivált sejt mikroszkópos képe az aktiválás előtt illetve után: 25/A, B ábra). A válaszadó sejtek aránya a TRPV1 aktiváció során 10,84% (4 válaszadó sejt 37-ből), TRPA1 esetében pedig 13,5% (5 válaszadó sejt 37-ből) volt. A kapszaicin azonnali választ váltott ki, amely 2 perc mosási lépés után is megismételhető volt (25/C ábra). Formalin aktiváció során 30-60 másodperc látenciaidő után detektáltunk kalciumjelet (25/D ábra).



25. ábra: Reprezentatív felvételek az endometrium sejtekbe történő Ca^{2+} -beáramlásról normál (A) és kapszaicinnel aktivált (B) endometrium sejtekről. Eredeti regisztrátumok a TRPV1 aktivátor kapszaicinnel (330nM, C) és TRPA1 agonista formalinnal (0,01%/3,3mM, D) kiváltott kalciumjelekről.

1.3.2. TRPA1/V1 receptoraktiváció hatása az IL1- β és iNOS génexpresszióra endometriumsejtekben

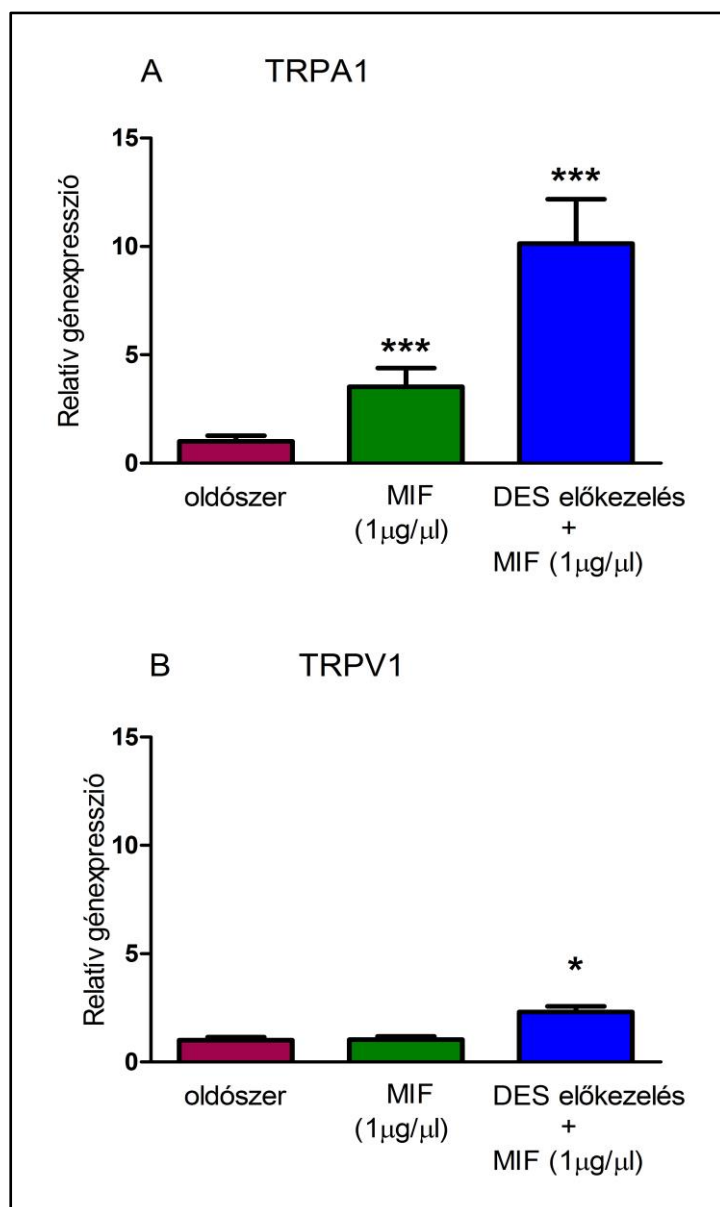
Szubkonfluens sejtenyészetet 24 órán át kezeltük 330 nM kapszaicinnal illetve 3,3 mM formalinnal, ezt követően az iNOS (26/A ábra) illetve IL-1 β (26/B ábra) gének expresszióját qPCR technika segítségével határoztuk meg. TRPV1 agonista kapszaicin hatására az iNOS génexpressziója 15-szörösére, az IL-1 β expressziója pedig ~10-szeresére emelkedett endometrium sejtekben. A TRPA1 agonista formalin kezelést követően mindkét gén esetében körülbelül 10-szeres expressziófokozódást tapasztaltunk.



26. ábra: Az iNOS (A) és IL-1 β (B) gének relatív expressziója endometriumsejtekben 330 nM kapszaicinnal és 3,3 mM formalinnal történő kezelést követően (n=4/ csoport). Az oszlopok a peptidil-prolil izomeráz-A (Ppia) génhez viszonyított génexpressziós értékeket reprezentálják (átlag $\pm$ SEM), amelyet $\Delta\Delta$ Ct módszerrel határoztuk meg. Statisztika: Egyutas ANOVA, Dunnett post-hoc teszt: ***p<0,0001. iNOS: indukálható nitrogén-monoxid szintáz, IL-1 β : interleukin-1 β .

1.4. TRPA1/V1 expressziónövekedése primer uterus sejtkultúrájában MIF kezelést követően

Kezeletlen és DES-kezelt állatokból származó primer uterus sejtkultúránkat 24 órán át inkubáltuk 1 µg/µl koncentrációjú MIF-fel, majd ezt követően a sejtekből RNS-t izoláltunk és a TRPA1/V1 gének expresszióját qPCR módszerrel határoztuk meg. MIF kezelést követően a TRPA1 génexpressziója ~3-szorosára emelkedett a primer uterus sejtekben, amely DES előkezelt állatok uterus sejtjeiben fokozottabban jelentkezett (~10-szeres expressziónövekedés, 27/A ábra). A TRPV1 receptor esetében a sejtek MIF-fel történő kezelése önmagában nem okozott változást a génexpresszióban, DES-előkezelt patkányok uterus sejtjeiben azonban ~2,5-szörös expressziófokozódást tapasztaltunk az oldószerrel kezelttekhez viszonyítva (27/B ábra).

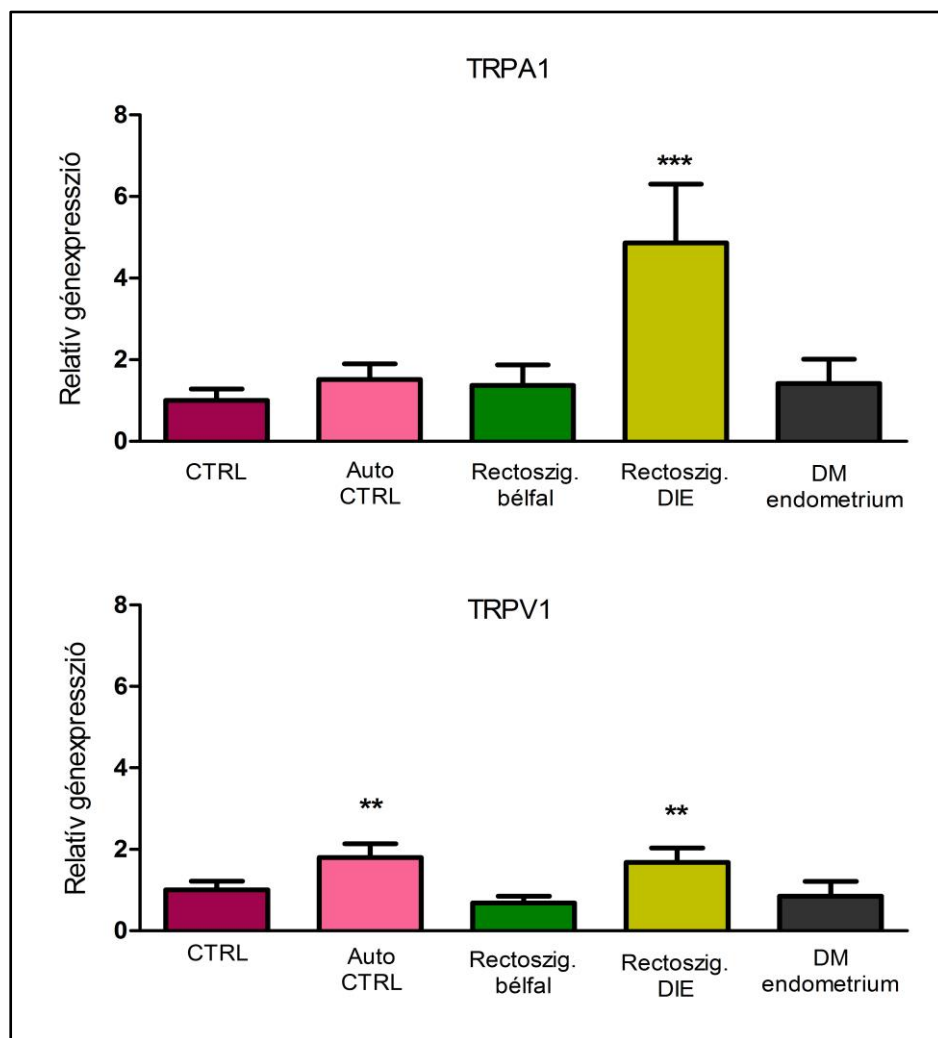


27. ábra: A TRPA1 (A), TRPV1 (B) receptor gének relatív expressziója 1 µg/µl MIF kezelés hatására kezeletlen illetve DES-kezelt állatok uterus primer sejtkultúrájában (n=4/ csoport). Az oszlopok a peptidil-prolil cisz-transz izomeráz-A (Ppia) génhez viszonyított génexpressziós értékeket reprezentálják (átlag±SEM), amelyet $\Delta\Delta Ct$ módszerrel határoztunk meg. Statisztika: Egyutas ANOVA, Dunnett post-hoc teszt: * $p<0,05$, *** $p<0,001$. MIF: makrofág migrációt gátló faktor; DES: dietil-stilbösztrol

2. A TRPA1 és TRPV1 receptorok expressziója DIE-ban

2.1. A TRPA1/V1 mRNS expresszió-fokozódása DIE lézióban

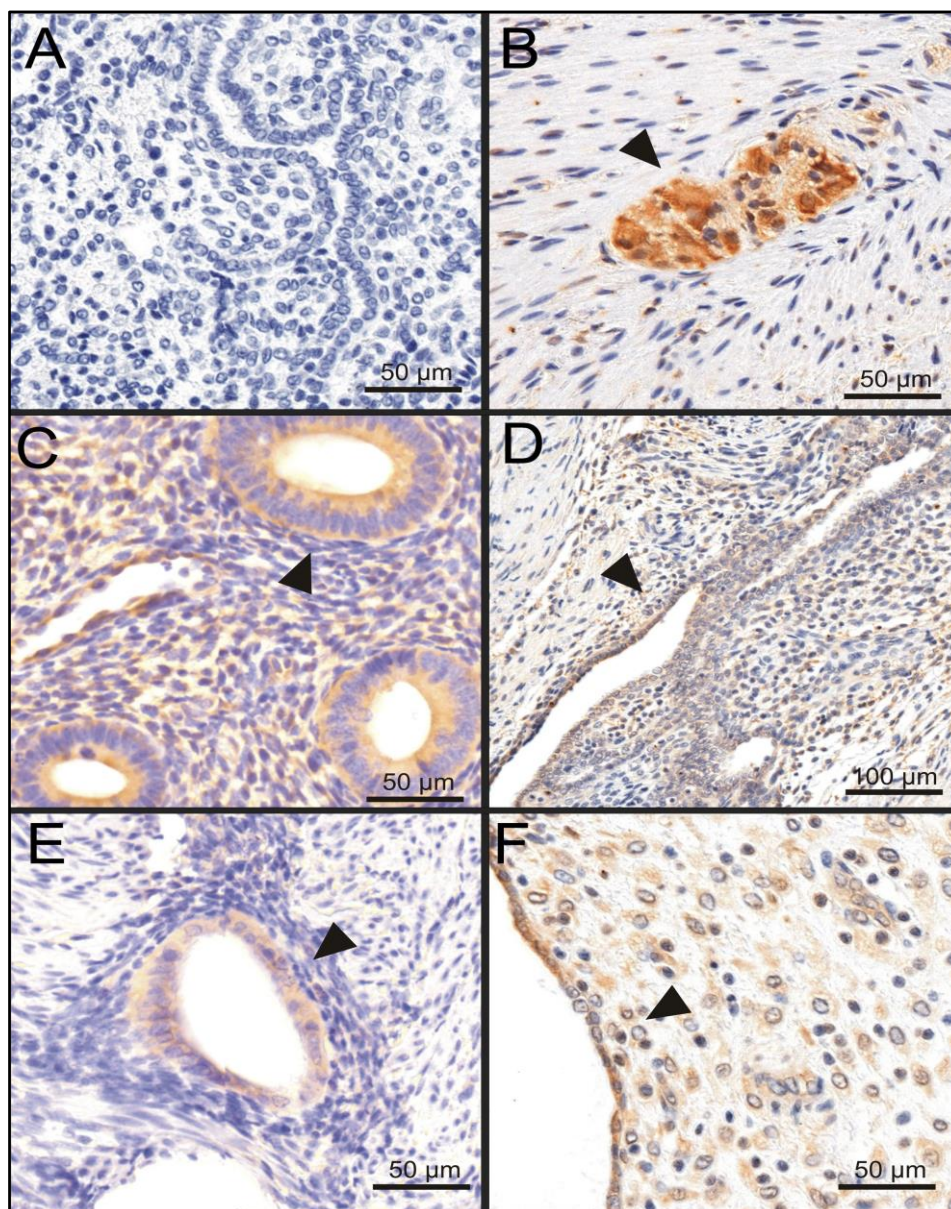
Mind a TRPA1, mind a TRPV1 receptort detektáltuk mRNS és fehérjeszinten is normál humán endometriumban, a detektálási küszöb ciklusszáma (Ct érték) 28-36 volt a qPCR reakció során. Rectosigmoid DIE lézióban szignifikáns, 5-6-szoros TRPA1 mRNS expressziónövekedést mértünk a kontroll, eutóp endometriumhoz hasonlítva (28/A ábra). A TRPV1 receptor tekintetében szintén szignifikáns, 2-szeres génexpresszió-növekedést detektáltunk szintén a DIE léziókban, ezen kívül az autológ eutópiás endometrium mintákban is emelkedett TRPV1 expressziót mértünk (28/B ábra). A rectosigmoid bélfal illetve a DM betegekből származó endometrium minta sem TRPA1 sem pedig TRPV1 mRNS expresszió tekintetében nem mutatott eltérést az egészséges mintákhoz képest.



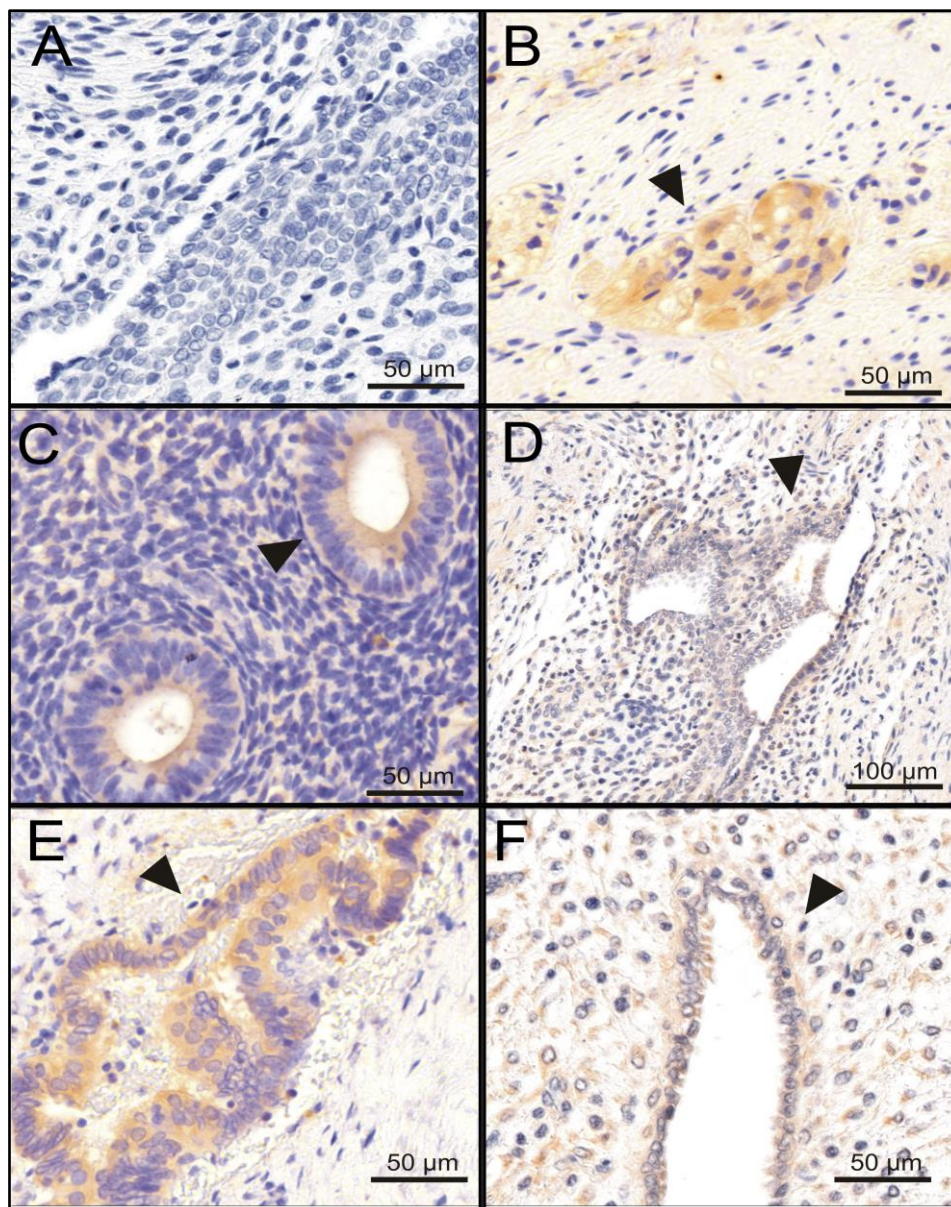
28. ábra: A TRPA1 (A), TRPV1 (B) receptor gének relatív expressziója mélyen infiltráló endometriózisban (DIE). Az oszlopok a riboszómális fehérje L29 (RPL29) génhez viszonyított génexpressziós értékeket reprezentálják (átlag±SEM), amelyet $\Delta\Delta C_t$ módszerrel határoztunk meg kontroll (n=6), eutóp endometrium (autokontroll, n=6), intakt autológ rectosigmoid bélfal (n=15) és DIE nodulusokban (n=15). Statisztika: Mann-Whitney U-teszt: **p<0,005, ***p<0,001. CTRL: kontroll; auto CTRL: autológ kontroll; DM: dysmenorrhea.

2.2. A TRPA1 és TRPV1 fehérje lokalizációja és emelkedése DIE mintákban

Egészséges endometriumban elszórt TRPA1/V1 immunpozitivitás detektálható a sztrómális és epitel sejtekben (29/C és 30/C ábra). DIE mintákban erőteljes intracelluláris TRPA1 és TRPV1 expresszió-növekedést detektáltunk (29/D-F és 30/D-F ábra) mindkét kompartmentben, emellett a normál endometriumhoz hasonlóan a glanduláris epitéliumban található erőteljesen festődés. Néhány ektópiás endometrium mintában a makrofágok és endotélsejtek intenzív TRPA1 és TRPV1 immunpozitivitást mutattak, míg a mienterikus intramurális ganglionok és plazmociták esetében a TRPA1 immunreaktivitás a TRPV1-nél nagyobb mértékűnek bizonyult.

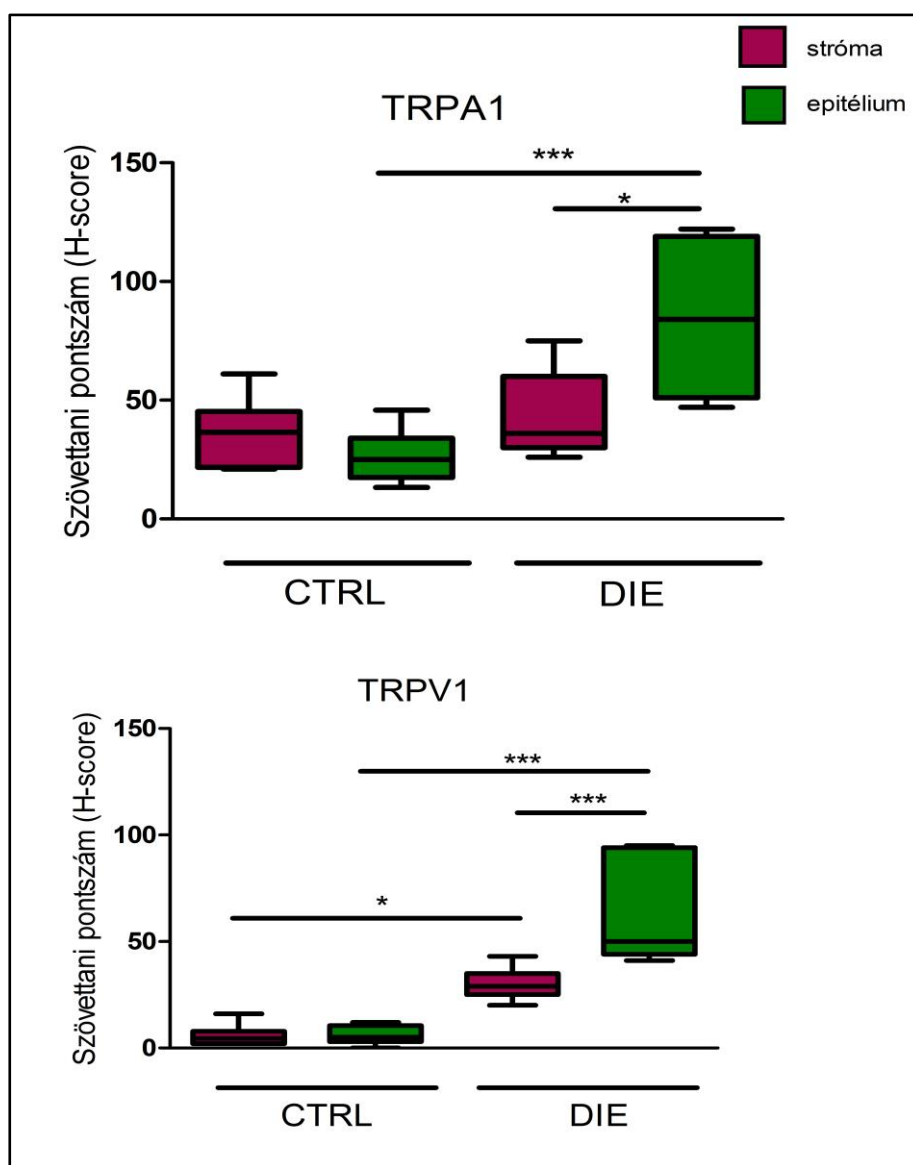


29. ábra: A TRPA1 receptor fehérje lokalizációja egészséges eutópiás endometriumban és DIE mintában. Negatív kontrollként egészséges endometrium metszetek szolgáltak elsődleges antitest nélkül (A). TRPA1 pozitív kontrollként rektális mienterikus ganglion metszetet használtunk (B). Egészséges eutópiás endometrium (C), rectosigmoid DIE lézió (D), rectosigmoid DIE lézió, glanduláris komponens (E), sztrómális komponens (F). A D-F panelen látható metszetek ugyanattól a betegtől származtak. A háttérfestést ezinnal végeztük. A nyilak a TRPA1 pozitív területeket jelölik. Nagyítás mértéke: 400x., kivéve D, ahol 200x.



30. ábra: A TRPV1 receptor fehérje lokalizációja egészséges eutópiás endometriumban és DIE mintában. Negatív kontrollként egészséges endometrium metszetek szolgáltak elsődleges antitest nélkül (A). TRPV1 pozitív kontrollként rektális mienterikus ganglion metszetet használtunk (B). Egzséges eutópiás endometrium (C), rectosigmoid DIE lézió (D), rectosigmoid DIE lézió, glanduláris komponens (E), sztrómális komponens (F). A D-F panelen látható metszetek ugyanattól a betegtől származtak. A háttérfestést eozinnal végeztük. A nyilak a TRPA1 pozitív területeket jelölik. Nagyítás mértéke: 400x., kivéve D, ahol 200x.

Az immunhisztokémiai metszetek szemikvantitatív analízise során számított szövettani pontszámok tekintetében szignifikáns TRPA1 immunpozitivitás emelkedést detektáltunk a DIE léziók epiteliális területein az egészséges mintákhoz viszonyítva, emellett különbséget mértünk DIE léziók strómális és epiteliális kompartmentjei között is (31/A ábra). A TRPV1 receptor esetében markáns, körülbelül 10-szeres fehérje expresszió-fokozódást detektáltunk az epitéliumban, a sztrómális komponens tekintetében pedig 5-szörös emelkedést detektáltunk a kontroll mintákhoz hasonlítva. A TRPA1-hez hasonlóan, a DIE mintákon belül az epiteliális TRPV1 expresszió szignifikánsan emelkedettebb volt, mint a sztrómális (31/B ábra).



31. ábra: TRPA1 (A) és TRPV1 (B) receptor immunreaktivitás szövettani pontszámai (H-pontszám) egészséges endometriumban (n=6) és DIE nodulus mintákban n=6). A pontszámokat a medián és az interkvartilis terjedelem (25-75 percentilis) ábrázolásával adtuk meg. Statisztika: Mann-Whitney U-teszt, * p < 0,05. ***p < 0.001.

2.3. A TRPA1/V1 immunpozitivitás korrelációja DIE-asszociált klinikai paraméterekkel

Az egyes vizsgálati csoportokba tartozó endometriózisos betegek demográfiai és klinikai paramétereinek numerikus fájdalomskálával történő értékelését a Pécsi Tudományegyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján Dr. Bohonyi Noémi végezte, az adatokat a 2. függelék tartalmazza.

A DIE-asszociált fájdalomparaméterek tekintetében, erős pozitív korrelációt detektáltunk a DM súlyossága és a strómális TRPA1 ($r_p=0,85$) és TRPV1 ($r_p=0,96$) immunpozitivitás emelkedése között. A dyspareunia súlyossága szintén pozitív korrelációban állt az ektópiás endometriumsejtek ($r_s=0,88$) és peritoneális makrofágok ($r_p=0,89$) TRPV1 pozitivitásának emelkedésével. Az epitélialis TRPA1 ($r_p=0,82$) és a strómális TRPV1 ($r_p=0,88$) expresszió-fokozódás szignifikáns mértékben korrelált a dyschezia súlyosságával. A korreláció analízis eredményét a 2. táblázat foglalja össze.

A	Stróma		Epitélium		Makrofág		Endotélium	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Dysmenorrhoea [#]	0,85	*	0,77	ns	0,44	ns	0,47	ns
Dyschezia [#]	0,72	ns	0,82	*	0,54	ns	0,41	ns
Dysuria	0,30	ns	0,42	ns	-0,67	ns	-0,21	ns
Dyspareunia	0,56	ns	0,42	ns	0,22	ns	-0,1	ns
IBS	0,80	ns	0,43	ns	0,71	ns	0,33	ns
Intersticiális cisztitisz	-0,1	ns	0,45	ns	-0,71	ns	-0,33	ns

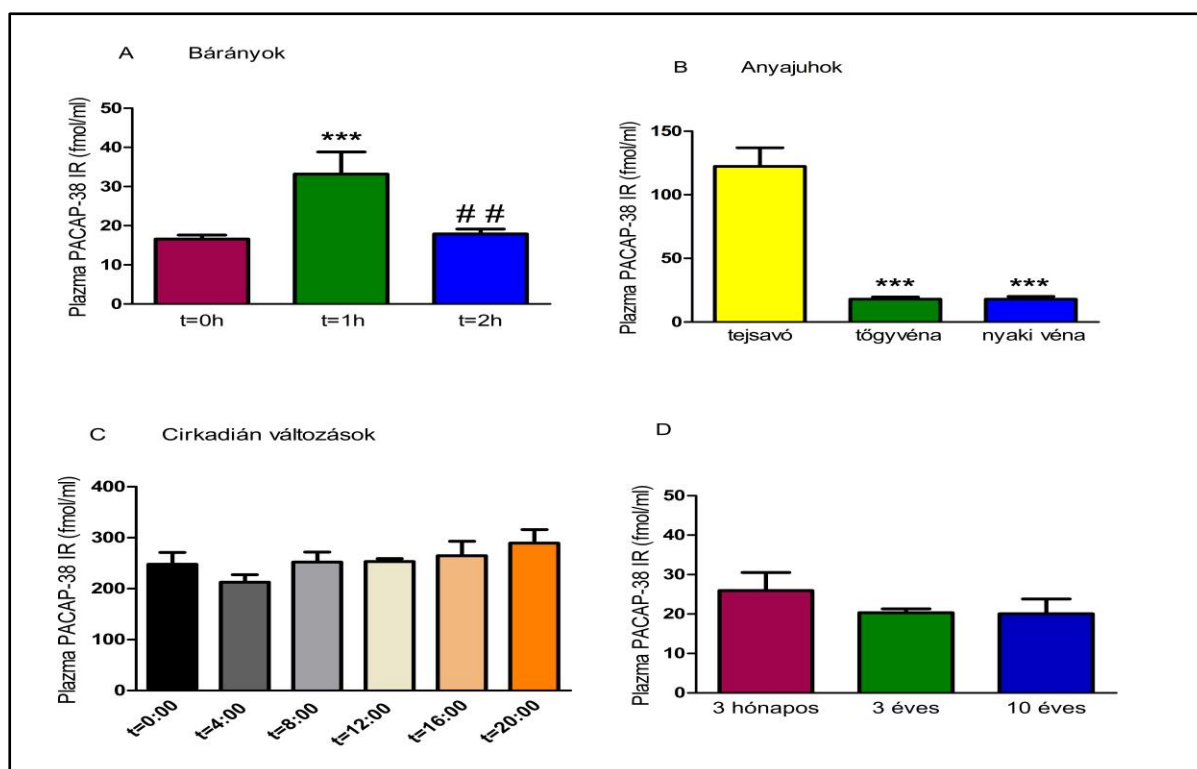
B	Stróma		Epitélium		Makrofág		Endotélium	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Dysmenorrhoea [#]	0,96	**	0,56	ns	0,56	ns	0,49	ns
Dyschezia [#]	0,88	*	0,71	ns	0,61	ns	0,41	ns
Dysuria	-0,19	ns	-0,3	ns	0,43	ns	-0,08	ns
Dyspareunia	0,64	ns	0,88	*	0,89	*	0,03	ns
IBS	0,82	ns	0,80	ns	0,21	ns	0,21	ns
Intersticiális cisztitisz	0,00	ns	-0,1	ns	0,53	ns	-0,21	ns

2. táblázat: A TRPA1, TRPV1 immunopozitivitás korreláció- analízise DIE- asszociált fájdalomparaméterekkel. A TRPA1 és TRPV1 immunopozitivitás mértékét szövettani pontozási rendszerrel, a DIE által kiváltott fájdalommentisások súlyosságát numerikus fájdalomskálával határoztuk meg. A párosított paraméterek korrelációs együtthatóját Kolmogorov-Smirnov normalitástesztet követően a parametrikus Pearson (# dysmenorrhoea és dyschezia) vagy a nem parametrikus Spearman (dysuria, dyspareunia, IBS, intersticiális cisztitisz) teszttel számítottuk ki. IBS: Irritabilis bél szindróma.

3. A PACAP vizsgálata juh emlő-és tejmintákban, valamint szopós bárányok plazmájában

3.1. PACAP38-IR mérése juh plazmában és bárányokban történő emelkedése szopás után

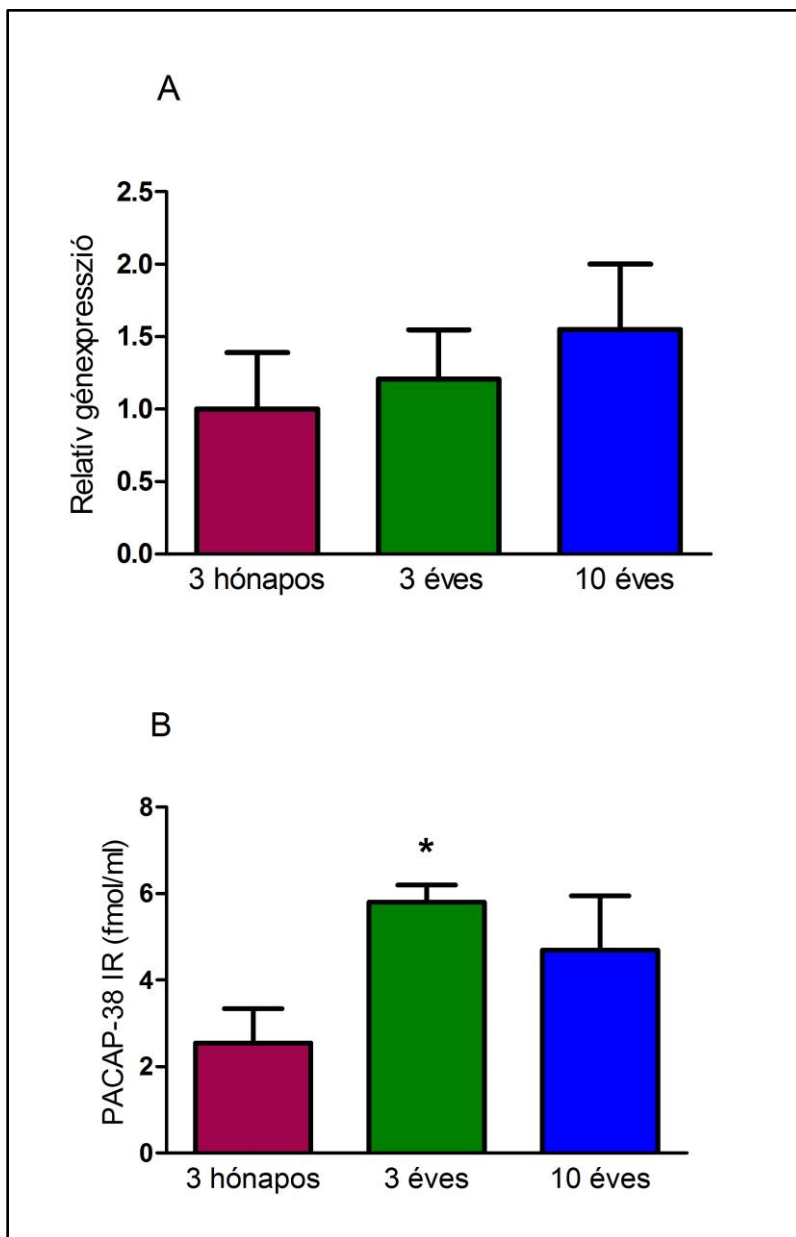
A specifikus RIA technikával mért PACAP38 koncentrációja bárányokban szopás előtt 20 fmol/ml értéket mutatott. Ez a peptid koncentráció a szopást követően egy órával szignifikánsan, kb. 1,5-szeresére emelkedett, majd szopás után 2 órával visszatért a kiindulási értékhez (32/A ábra). A PACAP38-IR mértéke juh tejmintákban nagyságrendekkel, nagyjából 10-szer nagyobb volt, mint ugyanazon tejelő anyák nyaki vénájából vett vérmintáiban. A nyaki és emlővénából vett vérminták PACAP38 koncentrációi között nem detektáltunk különbséget (32/B). A nap különböző időpontjaiban vett tejmintákat eredményeiből kitűnik, hogy a tejben lévő PACAP mennyisége független a diurnális ciklustól (32/C ábra). Továbbá eredményeinkből kiderül, hogy a plazma PACAP38-IR a különböző korcsoportokban megegyezik, életkorfüggő változás a peptid koncentráció tekintetében nem detektálható (32/C ábra).



32. ábra: A PACAP38-IR változása (A) szopós bárányok plazmájában szopás előtt (t=0h), szopás után 1 (t=1h), valamint 2 órával (t=2h) (n=9/ csoport). PACAP 38-IR mértéke az (B) anyatejjel összehasonlítva anyajuhok nyaki- illetve emlővénaájában (n=8/ csoport), valamint a (C) cirkadián ritmus függvényében (n=4/ csoport). A PACAP koncentrációjának alakulása (D) az életkor függvényében (n=4/ csoport). Statisztika: Egyutas ANOVA, ***p< 0,0001 (A panel ***p< 0,0001 t= 0h vs. t= 1h; ##p<0,005 t= 1h vs. t= 2h)

3.2. A PACAP mRNS-és fehérje expressziójának változásai juhemplőben

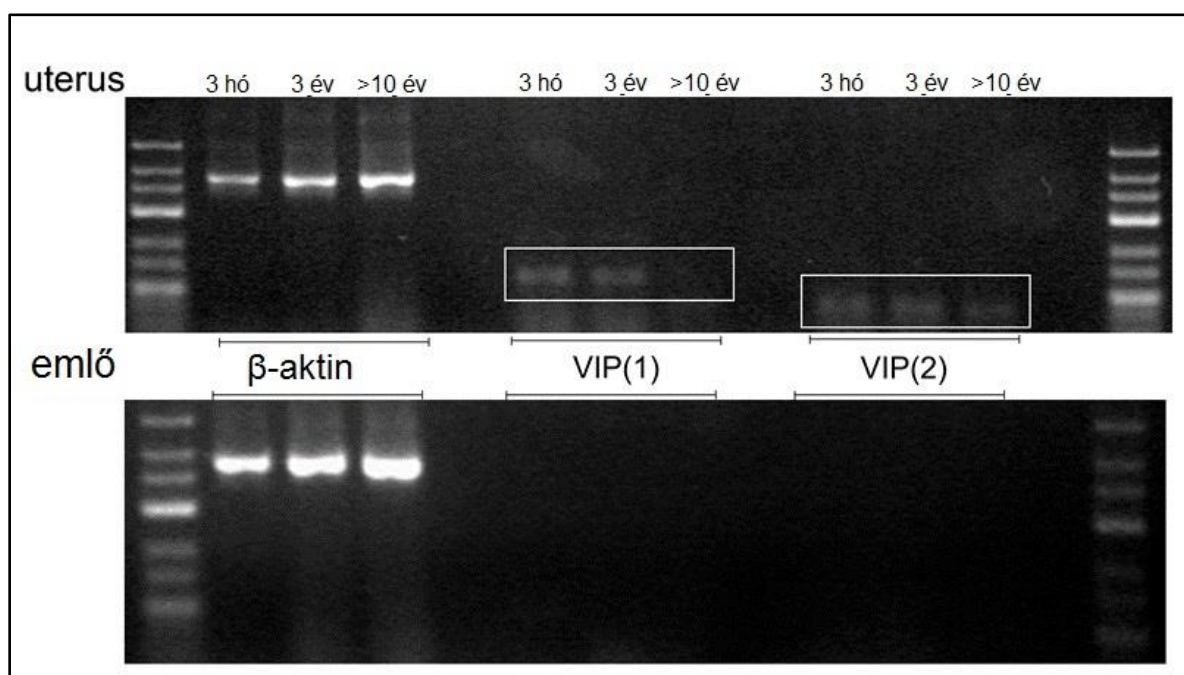
A PACAP mRNS expresszióját qPCR-al, fehérje expresszióját pedig RIA módszerrel határoztuk meg 3 hónapos, 3 éves és 10 éves juhok emlőmintáiban. A különböző korcsoportokban a génexpresszió tekintetében a PACAP (33/A ábra) nem detektáltunk szignifikáns eltérést. A PACAP fehérje expressziója 3 éves juhokban szignifikánsan, 3-szorosára emelkedett a bárányokhoz képest (33/B ábra) illetve magasabb értéket mutatott idős állatokban is, azonban ebben a csoportban az egyes egyedek koncentráció értékei nagyobb varianciát mutattak.



33. ábra: A PACAP mRNS (A), és fehérje expressziójának (B) változása 3 hónapos, 3 éves és 10 éves nőstény juhok emlő mintáiban (n=4/ csoport). Az génexpressziót reprezentáló oszlopok a β -aktin génhez viszonyított génexpressziós értékeket mutatják (átlag $\pm$ SEM), amelyet $\Delta\Delta Ct$ módszerrel határoztunk meg. Statisztika: Mann-Whitney U-teszt: *p<0,0001.**

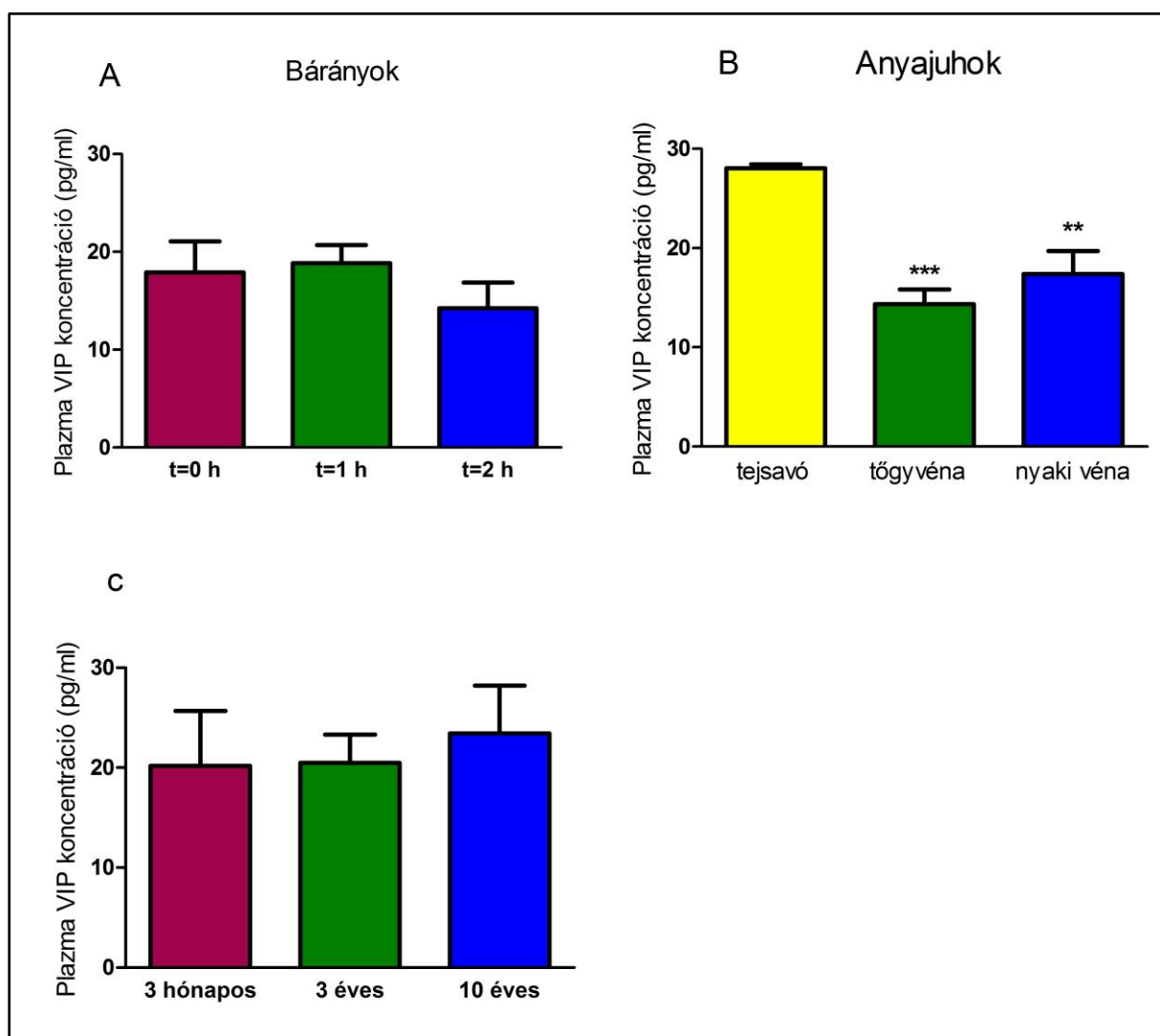
3.3. A VIP expressziójának vizsgálata juh emlőben, illetve plazma-és tejmintákban

A vizsgált emlőmintákban a PACAP-pal rokon VIP peptid mRNS expresszióját az alkalmazott primerek segítségével (1. táblázat) a pozitív kontrollként alkalmazott utereus mintákkal ellentétben egyik korcsoport esetében sem tudtuk kimutatni (34. ábra felső panel). Az emlő mintákban VIP-specifikus qPCR termékek nem az agaróz gélben nem jelentek meg (34. ábra alsó panel).



34. ábra: A VIP mRNS expresszió hiányának kimutatása szemikvantitatív PCR reakcióban, mindhárom vizsgálati csoportban. A kísérlet során pozitív kontrollként juh uterus mintát használtunk (felső panel). A mérés során kétféle primert teszteltünk [VIP(1) és VIP(2)]. A gélelektroforézis 0,01% GelRed-et (Biotum, Harward, CA, USA) tartalmazó 2,5%-os agaróz gélben történt, markerként Gene Ruler Low Range-t használtunk (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). A gélkép készítéséhez Vilber-Lourmat Bio-Profil géldokumentációs rendszert (verziószám: 97) és BioCapt™ (verziószám: 12.6) használtunk.

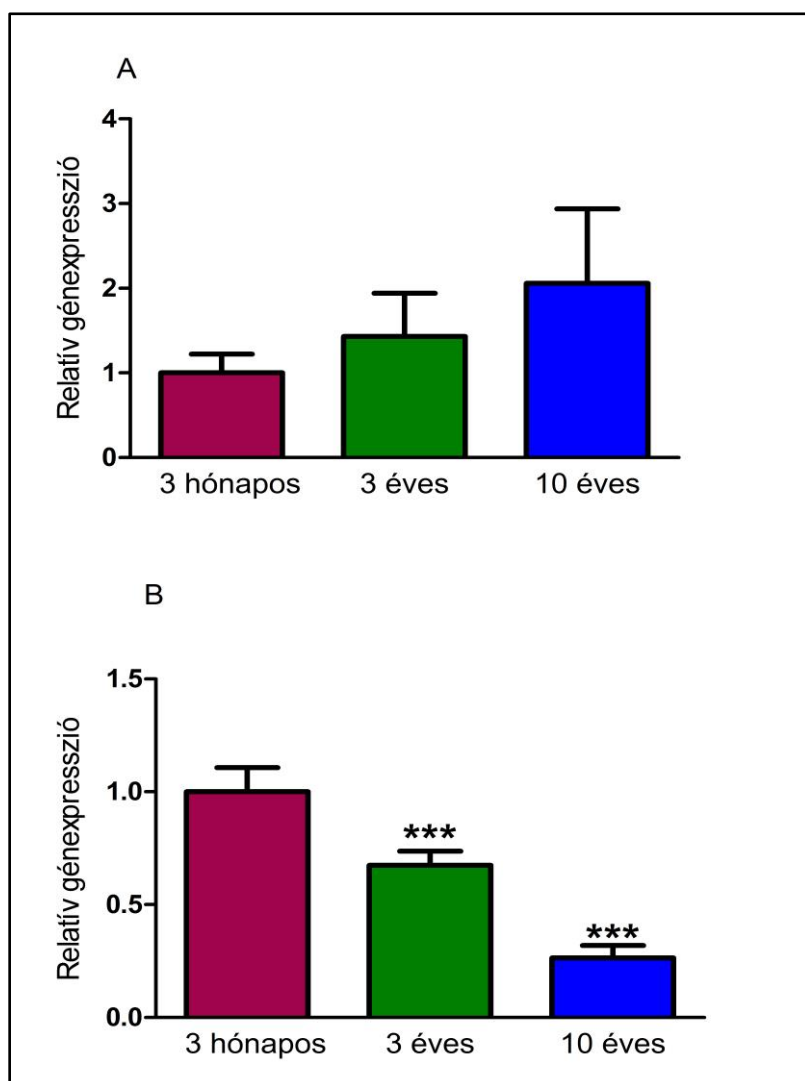
Bárányok plazmamintáiban a szopás előtt közvetlenül ~20 pg/ml VIP-et detektáltunk. Ez az érték a szopást követően egyik időpontban sem változott szignifikánsan (35/A ábra). Anyajuhok tejsavójában a PACAP-hoz hasonlóan, szignifikánsan magasabb VIP koncentrációt mértünk a tőgy-illetve nyaki vénához hasonlítva (35/B ábra). A plazma VIP koncentrációja az életkorral nem változik, hasonló értékeket detektáltunk bárányok illetve fiatal felnőtt és idős egyedek esetében (35/C ábra).



35. ábra: A VIP koncentrációjának változása (A) szopós bárányok plazmájában szopás előtt (t=0h), szopás után 1 (t=1h), valamint 2 órával (t=2h) (n=9/ csoport). A tejsavóban lévő VIP mennyiség (B) az anyajuhok nyaki-illetve emlővénájában mért értékekkel összehasonlítva (n=8/ csoport), valamint (C) az életkor függvényében (n=4/ csoport). Statisztika: Egyutas ANOVA, **p<0,005, ***p<0,0001.

3.4. A PAC1 receptor és a BDNF génexpressziójának vizsgálata emlőben

A PAC1 receptor előzetes várakozásainknak megfelelően mRNA szinten kimutatható volt mindhárom korcsoportból származó emlő homogenizátumban (36/A ábra). A relatív receptor expresszió nem mutatott szignifikáns eltérést egyik korcsoportban sem. A korcsoportok közül a 10 éves állatokban detektáltuk a legmagasabb PAC1 mRNA szintet. A BDNF génexpressziója az életkor előrehaladtával fokozatosan csökken, 3 éves állatok emlőmintáiban a bárányokhoz képest 30%-os, 10 éves állatokban pedig mintegy 60%-os génexpresszió csökkenést detektáltunk (36/B ábra).



36. ábra: A PAC1 receptor (A) és az agyi-eredetű neurotrofikus faktor (BDNF) (B) relatív génexpressziójának mértéke 3 hónapos, 3 éves és 10 éves nőtényi juhok emlőmintáiban (n=4/csoport). Az oszlopok a β -aktin génhez viszonyított génexpressziós értékeket reprezentálják (átlag $\pm$ SEM), amelyet $\Delta\Delta C_t$ módszerrel határoztunk meg. Statisztika: Mann-Whitney U-teszt; ***p<0,0001.

V. MEGBSZÉLÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

1. A TRPV1 és TRPA1 ioncsatornák, valamint a MIF jelenléte és ösztrogén kezelés hatására bekövetkező expresszió-változása patkány endometriumban

A méh belső falát borító endometrium olyan dinamikus struktúrájú szövet, melyben a proliferáció, differenciáció, dezintegráció majd regeneráció folyamatai ismétlődnek minden ciklusban. Ennek szabályozásában az ösztrogén és progeszteron mellett számos más molekula, pl. peptid hormonok, növekedési faktorok és citokinek is részt vesznek [198,199]. A bekövetkező morfológiai és funkcionális változások ma már jól ismertek, azonban a szabályozó mechanizmusok pontos működése a résztvevő jelátviteli útvonal diverzitásából adódóan még nem tisztázottak teljesen.

Munkánk során elsőként írtuk le a TRPA1 receptor mRNS expresszióját patkány endometriumban, valamint a TRPA1 és TRPV1 receptorok expresszió- növekedését szintetikus ösztrogén analóg vegyület hatására a MIF-fel korrelációban. A megfigyelt, ösztrogén-indukált TRPA1/V1 és MIF mRNS- növekedés alapján feltételezzük, hogy mind a receptorok, mind pedig a MIF részt vesznek a normál endometrium funkciók kialakításában a reprodukciós ciklus során. Jelen eredményeink hozzájárulhatnak patológiás, gyulladásal és fájdalommal járó nőgyógyászati kórképek jobb megértéséhez [32,155,175]. Primer uterus sejt kultúrán végzett receptor aktivációs vizsgálat segítségével bizonyítottuk, hogy a receptorok funkcionális állapotban vannak jelen az endometrium sejtek felszínén. A TRPA1 agonista formalin [200,201] és TRPV1 agonista kapszaicin előkezelt sejtekben emelkedett iNOS és IL-1 β expresszió növekedést detektáltunk, amely szintén a receptorok nem-neurális aktivációjához köthető. Ezek a mediátorok a ciklus során feltételezhetően részt vesznek az endometriumszövet lokális szabályozásában, ezen belül az NO-közvetített vazodilatációban, valamint az ovuláció, terhesség és deciduálisizáció során [202–204]. A receptorok funkcionalitását támasztja alá Greaves és munkacsoportjának tanulmánya is, melyben ektópiás endometrium sejtekben TRPA1 és TRPV1 aktiváció hatására NO és IL-1 β felszabadulást mértek [81]. 2011-ben egy munkacsoport szenzoros és autonóm neuropátiában szenvedő betegek leukocitáiban leírta, hogy az emelkedett szérumban MIF-szint hatására fokozott TRPV1 expresszió mérhető [205]. Kísérleteink során a MIF kezelés növelte mind a TRPA1, mind a TRPV1 relatív

génexpresszióját endometrium sejteken, valamint kimutattuk, hogy ebben a rendszerben a DES szinergista módon hat. A progeszteron a receptorok mRNS szintjét nem változtatta meg, fehérjeszinten azonban megnövelte azt ivaréretlen és ivarérett nőstény patkányokban. Ez a hatás valószínűleg a progeszteron β_2 -adrenerg receptor moduláló tulajdonságának következménye, amely indirekt módon képes a TRPV1 jelátvitel befolyásolására [206,207]. Érdekes módon, ovariectomia után emelkedett TRPA1, TRPV1 és MIF expressziót detektáltunk felnőtt patkányokban, amely a TRPA1 receptor esetében fehérjeszinten is kimutatható volt. Irodalmi adatok támasztják alá, hogy csökkent ösztrogénszint hatására a TRPV1 receptor expresszió-növekedése illetve stimulációja következik be, amely végül hiperalgéziához vezet [208–210]. DES-kezelés, valamint ovariectomia hatására szignifikáns MIF génexpresszió-növekedést tapasztaltunk. Bizonyított, hogy a citokin a természetes immunitás mellett számos más folyamatban is érintett, pl. angiogenezisben, proliferatív folyamatokban és szöveti átépülésben (remodelling). Ezen kívül anti-apoptotikus hatásai is vannak, amelyek nagyrészt CD74 receptor által közvetített módon zajlanak le, az endometrium esetében ez az epitél és sztróma sejtekben valósul meg [211].

Eredményeink alapján valószínűsíthetjük, hogy az endometrium sejtek a hátsó gyöki ganglion sejtekhez hasonlóan ösztrogén-függő expressziós mintázattal rendelkeznek [81,212] (37. ábra). A TRP receptorok szerepet játszhatnak egyes ösztrogén hatásra aktiválódó jelátviteli útvonalak működésében. A többi kation csatornához hasonlóan a TRPA1/V1 receptorok barrier molekulaként részt vehetnek a homeosztázis fenntartásában, a Ca^{2+} jelátvitelben, a sejtosztódásban és differenciációban, szabályozhatják az endometrium válaszkészségét, az embrió implantációt valamint szenzoros ideg-immun interakciókat közvetíthetnek [43]. Irodalmi adatokat alapján feltételezzük [77,210,213,214], hogy az endometrium sejtekben ösztrogén hatására bekövetkező perifériás szenzitizáció és receptor aktiváció IL-1 α , IL-1 β , NO, PGE₂, P-anyag, IL-8 és mátrix metalloproteináz-1 felszabadulásához vezet, melyek szerepet játszanak a szövet reproduktív, reparatív és pro-inflammatórikus folyamataiban [215,216] (37. ábra).

A vizsgálataink során nyert eredmények illeszkednek a továbbiakban humán mélyen infiltráló endometriózis mintákon kapott megfigyelésekhez és más irodalmi adatokhoz. Az endometriózis során detektálható emelkedett ösztrogénszint hatásai miatt a két terület összekapcsolható egymással. A TRPA1- és TRPV1 expresszáló nem-neurális endometrium sejtek valószínűleg ösztrogén mediált szenzoros, szekrétoros, gyulladáskeltő és fájdalomközvetítő szereppel bírnak patológiás körülmények között. Eredményeink elsőként

bizonyítják a nem-neurális TRPA1 és TRPV1 ioncsatornák ösztrogénfüggő és MIF-fel összefüggésben álló expresszió-fokozódását normál patkány endometriumában. Igazoltuk, hogy az ioncsatornák funkcionálisan aktív formában fejeződnek ki az endometrium sejteken. A MIF szignifikánsan megnöveli a TRPA1 és TRPV1 expresszióját, a krónikus ösztrogénhatás által szabályozott iNOS és IL-1 β génexpresszió pedig szerepet játszhat az endometriális homeosztázis kialakításában.

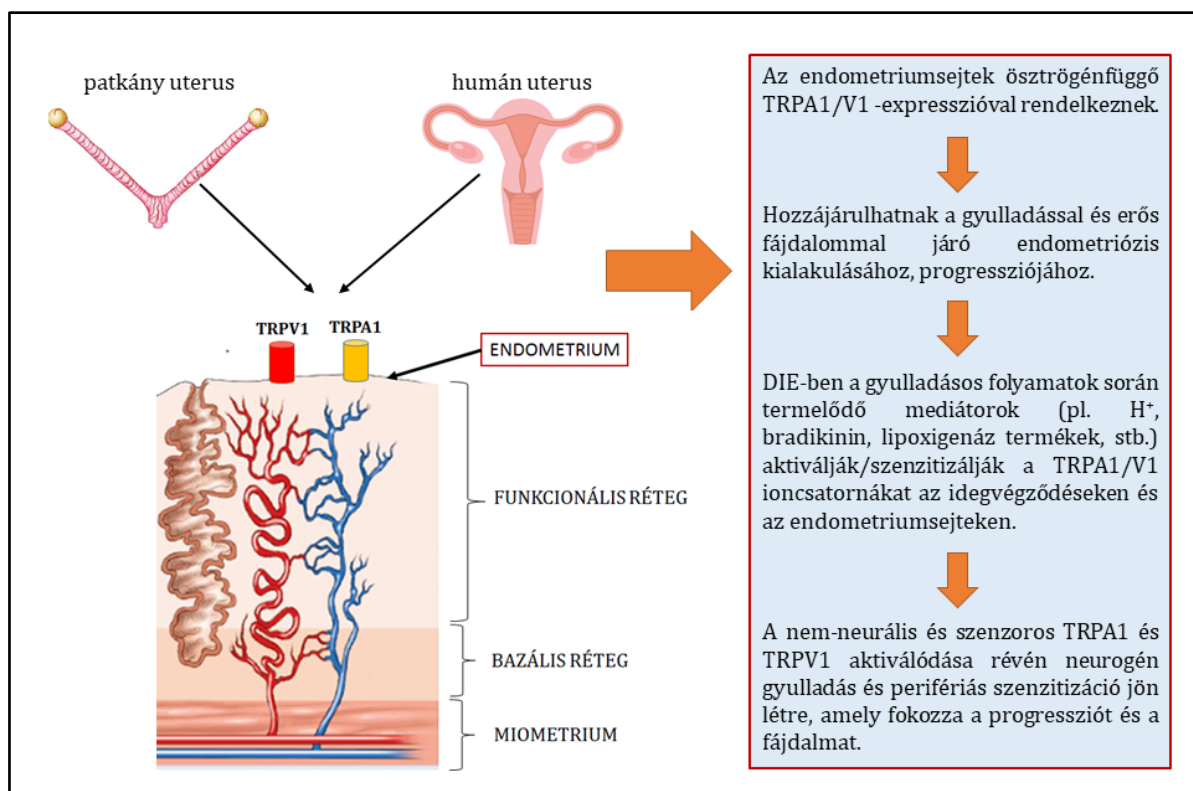
2. A TRPA1 és TRPV1 receptorok expressziója humán DIE-ban

PhD dolgozatomban bemutatott eredményeink szolgáltatják az első bizonyítékot a TRPA1 receptor jelenlétére normál humán endometriumában és a TRPA1 és TRPV1 receptorok expresszió-emelkedésére DIE léziókban. Az endometriózissal jellemző viszonylag magas prevalencia, az érintett betegek rossz életminősége és fertilitási problémái hívják fel a tudományos közösség figyelmét a kórképre. A nemzetközi egészségügyi szervezetek a bizonyítékokon alapuló orvoslás (Evidence Based Medicine = EBM) keretein belül ajánlásokat és terápiát dolgoztak ki az endometriózis kezelésére, de ezen erőfeszítések mellett is hiányosak a betegség kialakulásával kapcsolatos információink. A terápia gyógyszeres és minimál invazív sebészeti eljárásokból épül fel. A gyógyszeres terápia célja az ösztrogén proliferatív hatásainak felfüggesztése, amely az endometriózis léziói számára növekedési szignálként szolgálnak. Sebészeti beavatkozások alkalmával a primer diagnózis megerősítésén túl lehetőség nyílik a gyulladásos összenövések, a méh ligamentumrendszerének és malformációinak korrekciójára is. A lokális gyulladásos folyamatok kulcsfontosságú szerepet játszanak az endometriózissal összefüggő krónikus fájdalom patogenezisében, melynek kialakulásáért számos pro-inflammatórikus molekula felelős. A TRP receptorokat expresszáló idegi struktúrák nemcsak afferens funkciókkal rendelkeznek, hanem vazoaktív, pro-és anti-inflammatórikus neuropeptidek felszabadítására is képesek [25]. Az értekezésem első felében tárgyalt ösztrogén és MIF által szabályozott nem-neurális TRPA1/V1 expresszió pedig bizonyítékkal szolgál a receptorműködések kulcsfontosságára endometriumszövetben.

Vizsgálataink során emelkedett TRPA1 és TRPV1 génexpressziót figyeltünk meg endometriózisos betegek eutópiás endometriumában, amely eredmények összhangban állnak egyéb kutatási eredményekkel, melyek során a TRPV1 expresszió lokális emelkedését figyelték

meg endometriózis léziókban [31], [33], [71], [217]. A detektált TRPA1 és TRPV1 fehérje expresszió-növekedés a rectosigmoid DIE léziók sztrómális és epitel rétegeiben a receptorok szenzoros funkcióinak meglétét feltételezik. Egyre több bizonyíték támasztja alá azt a hipotézist, miszerint a TRPV1 expresszálo idegvégződések kulcsszerepet töltenek be az endometriózissal összefüggő alhasi fájdalom kialakulásában (37. ábra). Peritoneális endometriózisban a TRP receptorok interferálhatnak a gyulladásos peritoneális környezettel, így növelve a betegek fájdalomérzetét és elősegítve a krónikus fájdalom létrejöttét [218]. Liu és munkatársai funkcionálisan aktív TRPV1 receptorok jelenlétét írták le humán endometriózis mintákból nyert endometriális sztróma sejt kultúrán, melyen PGE₂ és TNF α hatására emelkedett TRPV1 mRNS expressziót detektáltak. A nem-neurális TRPV1 receptort a neurálisnál alacsonyabb aktivációs küszöb jellemzi, farmakológiai aktivációjuk hatására a sejtekből NO és IL-1 β felszabadulás következik be [32]. Ennek analógiájára DIE esetében a léziókban kifejeződő TRPV1 receptor aktiválódásának következtében is ugyanez a hatás feltételezhető. Ezen túlmenően, a pro-inflammatorikus kaszkád aktivációjának eredményeként a nem-neurális TRPV1 szenzitizációja is bekövetkezik, amely gyulladásos körfolyamatot indukál [219–221]. Endometriózisos betegekben magas COX-2 enzim szint jellemző mind az eutópiás, mind az ektópiás endometriumban, amely magyarázatot adhat a nem-szteroid gyulladáscsökkentő farmakonok hatásosságára endometriózis-asszociált alhasi fájdalom kezelésében [222,223]. Az ektópiás endometriumban expresszáló TRPV1 receptor aktiválható COX-2, NGF és szabad oxigén gyökök révén is [32,221], [224,225]. Az idegvégződéseken található TRPA1 és TRPV1 között lejátszódó keresztaktiváció és a nem-neurális receptorok aktiválódása perifériás szenzitizáció és nocicepció kialakulásához vezet [43], [226,227]. A kialakuló hosszantartó perifériás szenzitizáció olyan központi idegrendszeri változásokat indukál, amely magyarázatul szolgál a betegek körében tapasztalható egyénenként is eltérő fájdalomérzet változatosságára, az endometriózis típusától és súlyosságától függetlenül [228]. A TRPV1 pozitív idegvégződések aktivációjának eredményeként neurogén gyulladás és neuropeptid exkrécia történik (P-anyag, CGRP) [15]. Ehhez hasonló folyamat nem-neurális TRPV1 receptorok aktivációjának hatására is bekövetkezik, mely jelenséget az urotéliumban, eptéliumban és a hallószőrökben is leírták [32,81,229,230]. A DIE páciensekre jellemző, bélrendszert érintő összenövések feltételezhetően megnövekedett mechanikai stresszként jelentkeznek [214], ebből adódóan, az adhéziók okozta adódó szervi torzulások közvetlenül hozzájárulhatnak a TRPA1 expresszió emelkedéséhez. A DIE léziókban bizonyítottan jelenlévő reaktív oxigén oxigénszármazékok (pl. NO), inflammatorikus komponensek és hipoxia szintén fokozzák a TRPA1 expressziót, illetve aktiválják a csatornát [214,231]. A sztrómális TRPA1 és

TRPV1 immunreaktivitás korrelációt mutat a DM súlyosságával, az ektópiás epitélisejteken és makrofágokon kimutatott TRPV1 expresszió pedig a dyspareuniával. A dyschezia erőssége egyformán korrelál mindkét receptor strómális és epiteliális expressziójával. Egyre több bizonyíték támasztja alá egy ok-okozati viszony jelenlétét az endometriózis és a vizsgált fájdalomparaméterek között, amely viscero-viszcerális szenzitizációs mechanizmusokra és neurogén komponensekre vezethető vissza [228,232,233]. Az uterus innerváció tekintetében osztozik a húgyhólyaggal és a vastagbéllel. [234,235]. Állatmodellekben végzett vizsgálatok kimutatták, hogy hátsó gyöki ganglionok egy TRPA1/V1 expresszáló szubpopulációja részt vesz az uterus-rectum, uterus-húgyhólyag és húgyhólyag-rectum eredetű neuronokból származó ingerületek feldolgozásában [236,237]. Ebből következik, hogy az érintett idegpályákban bekövetkező változások a tünetek átfedéséhez vezethetnek, gerincvelői szinten megvalósuló konvergencia, illetve a szervek közötti szenzitizációs mechanizmusok révén (pl. DM, dyschezia, dysuria, IBS) [238,239]. Patkányokban intrauterin kapszaicin kezelést követően az alsó húgy utak, mustárolaj hatására pedig a disztális colon szenzitizációját figyelték meg [240,241]. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a DIE lokálisan, a colon TRPA1/V1 expresszáló afferenseinek szenzitiációja révén neuropeptidek (P-anyag, CGRP) felszabadulását eredményezi, amely végül neurogén gyulladás és perzisztáló fájdalom kialakulásához vezet (37. ábra).



37. ábra: Eredmények összefoglalása I.: A nem-neurális TRPA1 és TRPV1 ioncsatornák szerepe patkány és humán endometriumban, valamint mélyen infiltráló endometriózisban (DIE).

3. A PACAP vizsgálata juh emlő-és tejmintákban, valamint szopós bérányok plazmájában

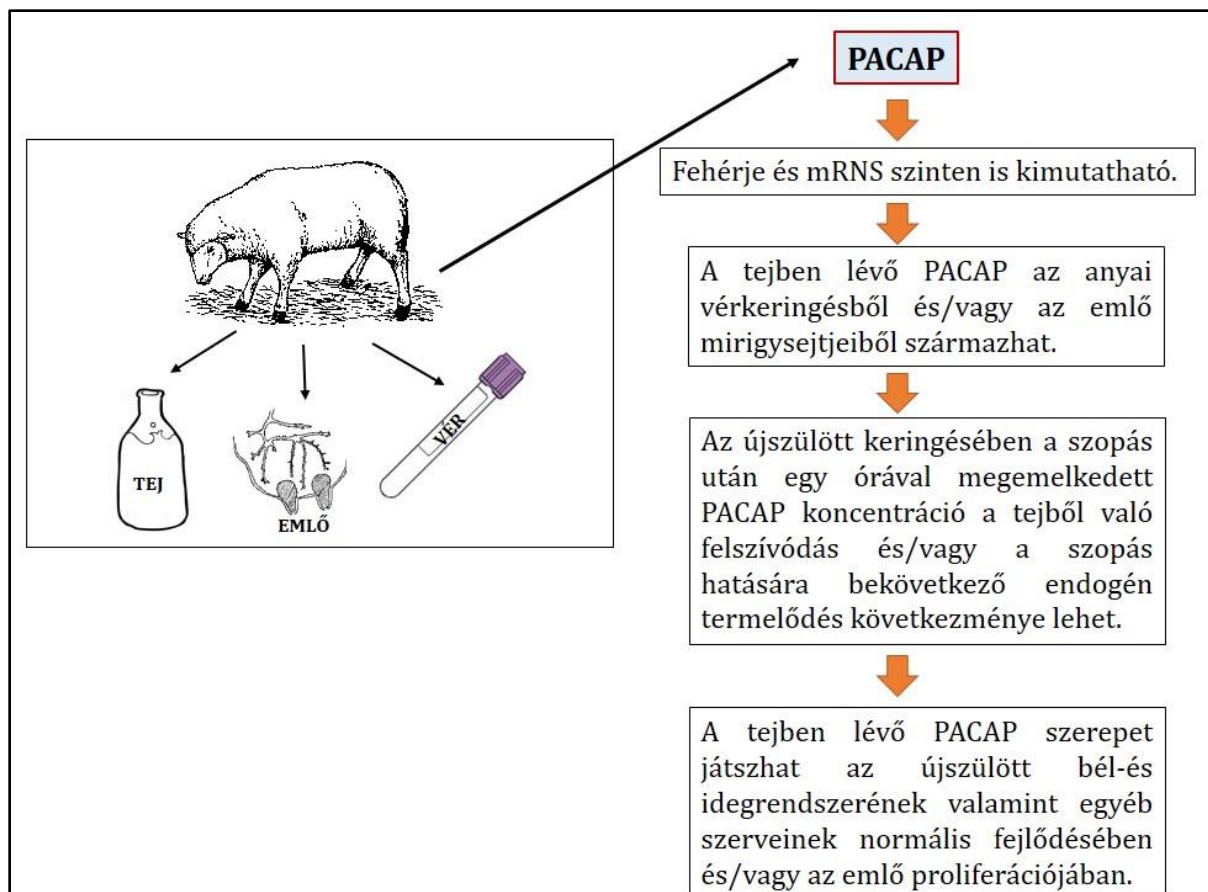
Az anyatejben lévő bioaktív komponensek, immunglobulinok, vitaminok, növekedési faktorok, citokinek, hormonok és fehérjék biztosítják az újszülött számára a megfelelő tápanyagellátást és a kórokozókkal szembeni ellenálló képességet. Kutatási eredményeink szolgáltatják az első bizonyítékot a PACAP expressziójára laktáló juhok emlőjében, valamint kimutattuk, míg a peptidcsalád másik tagja, a VIP nem expresszálódik ebben a szövetben. Az újszülöttek bélrendszere kulcsfontosságú szerepet játszik a tej összetevőinek felszívódásában, mivel a benne található fehérjék nagy része pinocitózis révén intakt formában abszorbeálódik több fajban is, pl. kőrödzőkben [242], sertésben [243] és kutyában [244]. Emberben és rágcsálókban ez azonban mindössze a születést követő pár napra korlátozódik. Az anyatej-

összetevők emésztésének hatékonysága a születést követő egy hónapon belül folyamatosan nő, ebben az időszakban főként a passzív immunitás kialakulásában szerepet játszó immunglobulinok abszorpciója történik [245]. Annak ellenére, hogy az anyatejből az újszülött keringésébe kerülő PACAP mennyisége nem ismert, szopós bányák plazmájában a szopás után egy órával emelkedett PACAP koncentrációt mértünk. Eredményeink a PACAP gyors felszívódását valószínűsítik, bár a szopás által kiváltott endogén PACAP felszabadulása sem zárható ki.

Ember esetében az anyatej PACAP koncentrációja a laktációs periódus 10. hónapjáig konstans mértékben magas, majd a 11. és 17. hónap között lecsökken [136]. Tanulmányok bizonyítják, hogy a tehéntej az emberivel nagyjából megegyező mennyiségű PACAP-ot tartalmaz, melynek jelentősége kiemelten fontos, tekintve, hogy a forgalomban kapható tápszerek tehéntejalapú készítmények. A peptid kérődző állatok tejében (szarvasmarha, juh, kecske) a plazmához képes tízszeres mennyiségben van jelen, amely anyajuhok tejében még emelkedettebb a laktáció első három hónapjában. Kísérleteink során nem figyeltünk meg cirkadián függő PACAP koncentrációt a tejben és nem találtunk különbséget a nyaki-és emlővéna PACAP koncentráció értékeiben sem. Eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy a tejben mérhető nagy mennyiségű peptid részben az emlőben lévő mirigysejtekből, részben pedig az anyai keringésből származhat (38. ábra).

Az emlőmirigyek proliferációja és differenciációja hormonális, kemokin, citokin és angiogenikus faktorok hatására következik be [246]. Ismert, hogy a PACAP befolyásolja a vaszkuláris endoteliális növekedési faktorok szintézisét, emellett hatással van számos citokin és kemokin (pl. az amphiregulin, EGF) lokális expressziójára is [125]. Annak ellenére, hogy a VIP a prolaktin felszabadulás szabályozásán keresztül központi szereppel bír a laktáció szabályozásában, egy korábbi közleményt megerősítve [127] a vizsgált emlőszövetmintákban nem detektáltunk VIP specifikus mRNS-t egyik korcsoportban sem. Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a VIP a PACAP-hoz hasonlóan nagyságrendekkel magasabb koncentrációban van jelen a tejben, eredményeinket összegezve tehát feltételezhetjük, hogy a tejben lévő VIP az anyai keringésből származik. A központi idegrendszerben a PACAP és a VIP részt vesz a neurotrofikus faktor BDNF regulációjában. Az említett peptidek protektív hatása kortikális neuronokon, neuroblasztokon és asztrocitákon BDNF-mediált útvonalon zajlik [136,140]. A BDNF-et a központi idegrendszeren kívül számos más szövetben is leírták, pl. a légutakban és a bélrendszerben is [247]. Mérési eredményeink konzisztensek Colitti és munkacsoportja közleményében leírtakkal, melynek során a BDNF és NGF, valamint receptoraik expresszióját

vizsgálták fiatal, ivaréretlen, valamint tejelő anyajuhok emlőjében [248]. Ivaréretlen, valamint ellés előtt álló felnőtt juhok mintáiban magas BDNF expressziót mértek, amely a laktáció előrehaladtával fokozatosan csökkenő tendenciát mutatott. Vizsgálatainkban az életkorral fordítottan arányos, szignifikáns BDNF expresszió-csökkenést detektáltunk, míg a PACAP expresszió tekintetében nem volt különbség. Ez az eredmény a BDNF potenciális szerepére utal az emlő korai fejlődése során, melynek részletes tisztázásához, valamint a PACAP és BDNF között fennálló összefüggések felderítéséhez további vizsgálatok szükségesek. Munkánk során specifikus RIA technikával bizonyítottuk, hogy a PACAP nagy mennyiségben és konstans módon van jelen juhok tejében (38. ábra). Eredményeinket összegezve feltételezzük, hogy a tejben lévő nagyfokú PACAP akkumuláció az anyai vérkeringésből történő infiltráció és emlő peptidtermelésének együttes következménye. Valószínűsítjük, hogy a szopós bárányok plazma PACAP38-IR értékének növekedése a tejben lévő PACAP gyors felszívódásának következtében alakul ki, fontos azonban megjegyezni, hogy a bárányokban szopás hatására bekövetkező endogén eredetű PACAP felszabadulása is szerepet játszhat a folyamatban (38. ábra). Vizsgálataink új perspektívát szolgáltatnak a PACAP szerepének szélesebb körű feltérképezéséhez illetve a peptid újszülöttekben illetve tejmirigyben betöltött szerepére vonatkozóan.



38. ábra: Eredmények összefoglalása II.: Anyajuhok és bányók plazmájában és tejében jelen lévő PACAP potenciális szerepének összefoglalása.

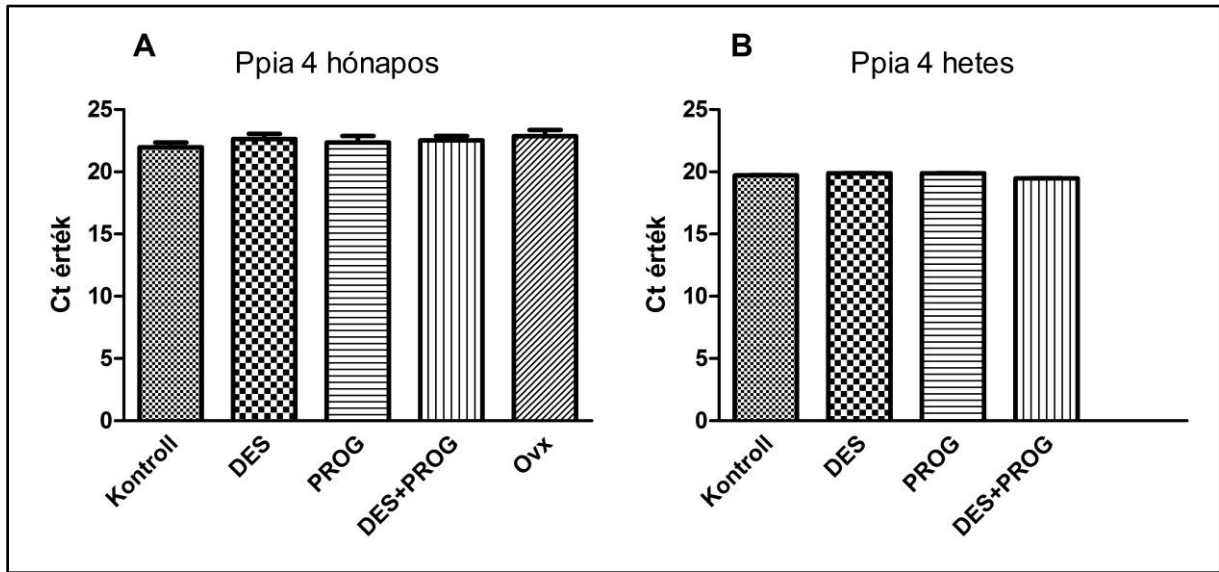
ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS EGYSÉGES ÉRTELMEZÉSE

1) Kísérleteink során elsőként bizonyítottuk funkcionálisan aktív nem-neurális TRPA1 és TRPV1 ioncsatornák expresszióját a MIF-fel összefüggésben patkány endometriumban. DES- és MIF kezelések hatására szignifikáns TRPA1/V1 expresszió-növekedést detektáltunk. TRPA1 és TRPV1 agonista kezelés emelkedett gyulladásos mediátor (iNOS és IL-1 β) növekedést eredményezett, amely a vizsgált ioncsatornák endometriumsejteken át megvalósuló jelátvitelét igazolta. Az endometrium sejtek ösztrogén-függő TRPA1/V1 expressziót mutatnak, és szerepet játszhatnak ösztrogén hatásra aktiválódó jelátviteli útvonalak működésében, melyek szenzoros, szekretoros, gyulladásokeltő és fájdalomközvetítő szereppel bírnak patológias körülmények között.

2) Humán egészséges és DIE lézió mintákban elsőként írtuk le a TRPA1 és TRPV1 receptorok jelenlétét, valamint kimutattuk, hogy a TRPA1 ioncsatorna az endometriózisos mintákban szignifikánsan nagyobb mennyiségben van jelen. DIE lézió a béltraktusban mechanikai és kémiai stimulusok révén szenzitizálhatja a TRPA1 és TRPV1 receptort, amely lokális neuropeptid felszabaduláshoz vezet, ezáltal neurogén gyulladást és perzisztens fájdalmat idéz elő.

3) A PACAP konstanst módon van jelen juhok plazmájában, minden vizsgált korcsoportban, koncentrációját a kor jelentősen nem befolyásolja. Juhtejben nagyságrendekkel magasabb peptid koncentráció mérhető, mint a plazmában, A tejben lévő PACAP akkumuláció az anyai vérkeringésből történő szekréció és az emlő peptidtermelésének együttes következménye lehet. Szopós bányák plazmájában a szopás után 1 órával szignifikáns PACAP38-IR növekedés mérhető, melynek kialakulása PACAP38 gyors felszívódásának és/vagy a pepdig szopás hatására történő termelődésének következménye lehet. Annak ellenére, hogy a VIP központi szabályozó szerepe bizonyított a laktáció során, az általunk vizsgált kísérletekben az emlőszövet és plazmamintákban nem detektáltunk VIP expressziót ill. változásokat.

FÜGGELÉK



1. függelék: A peptidil-prolil izomeráz-A (Ppia) gén expressziójának változásai (Ct érték) a vizsgált 2 életkorban, az alkalmazott kezelések függvényében. DES: dietilstilbösztrol, PROG: progeszteron, Ovx: ovariectomia.

Besorolás	1. csoport (n=15)	2. csoport (n=6)	3. csoport (n=6)	p érték
Életkor (év)	33,5 ± 4,2	36,7 ± 6,2	31,4 ± 6,7	
BMI	21,4 ± 33	21,8 ± 25	26,0 ± 73	
Első menstruáció ideje (év)	12,9 ± 1,0	13,0 ± 1,3	13,6 ± 0,8	
Ciklus átlagos időtartama (nap)	29,3 ± 1,8	28,4 ± 2,4	29,6 ± 2,8	
Menstruáció átlagos időtartama (nap)	5,0 ± 0,9	5,4 ± 1,3	4,0 ± 1,0	*p _{MW} = 0,0485 #p _{St} = 0,0377
Ciklus aktuális fázisa proliferatív (1-14 nap) szekrétoros (15-28 day) nincs adat	7 (46,7%) 4 (26,7%) 4 (26,7%)	6 (85,7%) 1 (14,3%) 0 (0,0%)	4 (57,0%) 2 (29,0%) 1 (14,0%)	
Graviditás 0 1 ≥2	9 (60,0%) 6 (40,0%) 0 (0,0%)	2 (28,6%) 1 (14,3%) 4 (57,1%)	6 (86,0%) 1 (14,0%) 0 (0,0%)	#p _{MW} = 0,0373
Paritás 0 1 ≥2	11 (73,3%) 4 (26,7%) 0 (0,00%)	2 (28,6%) 1 (14,3%) 4 (57,14%)	6 (86,0%) 1 (14,0%) 0 (0,0%)	#p _{MW} = 0,0373
DM súlyossága a műtét időpontjában (NRS)	8,7 ± 1,2	4,3 ± 0,8	0,0	****p _{MW} < 0,0001 ###p _{MW} = 0,0006
Dyschezia súlyossága a műtét időpontjában (NRS)	6,2 ± 3,7	0,0	0,0	
Dysuria súlyossága a műtét időpontjában (NRS)	4,0 ± 4,6	0,0	0,0	
Dyspareunia súlyossága a műtét időpontjában (NRS)	2,4 ± 2,8	0,0	0,0	

2. függelék: A betegek demográfiai eloszlása és fájdalomparaméterei. A vizsgálatban résztvevő összes páciens operációja A Pécsi Tudományegyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján történt, a mintavételt Dr. Bohonyi Noémi végezte. A kürettel vett minták beosztása a következő: 1-es csoport (n=15): *rectosigmoid* DIE, súlyos DM-mel kombinálva; 2-es csoport/ kontroll csoport (n=7): fibroid indukált mérsékelt DM; 3-as csoport (n=6): tubális eredetű infertilitás fájdalom nélkül. A Kolmogorov-Smirnov normalitástesztet követő statisztikai analízist normál eloszlás esetében Student's t-tesztel (p_{St}) (# p<0.05, ### p<0.001 2. csoport vs. 3. csoport) nem normáloszlásnál pedig Mann-Whitney U tesztel (p_{MW}) (* <0.05, **** p<0.0001 1. csoport vs. 3 csoport) végeztük. Az eredményeket átlag±SEM formában fejeztük ki.

DIE: mélyen infiltráló endometriózis/ deep infiltrating endometriosis; DM: dysmenorrhea;
BMI: testtömeg index, NRS: Numerikus fájdalomskála.

IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Tresh JC., Capsaicin, the active principle in Capsicum fruits, Pharm. J. Trans. 3 (7) (1876) 148–149.
- [2] Spaeth E., Darling SF., Synthese des Capsaicins, Berichte Der Dtsch. Chem. Gesellschaft. 63 (1930) 737–743.
- [3] Nelson EK., The constitution of capsaicin, the pungent principle of Capsicum II., J. Am. Chem. Soc. 41 (1919) 597–599.
- [4] Högyes E., Mittheilungen aus dem Institute für allgemeine Pathologie und Pharmakologie an der Universität zu Klausenburg, Arch. Für Exp. Pathol. Und Pharmakologie. 9 (1878) 117–130.
- [5] Jancsó N., Role of nerve terminals in the mechanism of inflammatory reactions., Bull. Millard Fill. Hosp. 7 (1960) 32–41.
- [6] Wallace M. és, Pappagallo M., Qutenza®: a capsaicin 8% patch for the management of postherpetic neuralgia., Expert Rev. Neurother. 11 (2011) 15–27. doi:10.1586/ern.10.182.
- [7] Szolcsányi J., Jancsó-Gábor A., Sensory effects of capsaicin congeners. Part II : Importance of chemical structure and pungency in desensitizing activity of capsaicin-type compounds, Arzneimittelforschung. 26 (1976) 33–37.
- [8] Szállási A., Blumberg PM., Specific binding of resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog, by dorsal root ganglion membranes, Brain Res. 524 (1990) 106–111. doi:10.1016/0006-8993(90)90498-Z.
- [9] Szállási A., Szolcsányi J., Szállási Z., Blumberg PM., Inhibition of [3H] resiniferatoxin binding to rat dorsal root ganglion m ... compounds with capsaicin-like activity ., Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 344 (1991) 172–181.
- [10] Jancsó G., Kiraly E., Jancsó-Gábor A., Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones, Nature. 270 (1977) 741–743. doi:10.1038/270741a0.
- [11] Caterina M. J., Schumacher M. A., Tominaga M., Rosen T. A., L.J. D., Julius D., The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway., Nature. 389 (1997) 816–824. doi:10.1038/39807.
- [12] Tominaga M., Caterina M. J., Malmberg A. B., Rosen T. A., Gilbert H., Skinner K., Raumann B. E., Basbaum A. I., Julius D., The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-

- producing stimuli, *Neuron*. 21 (1998) 531–543. doi:10.1016/S0896-6273(00)80564-4.
- [13] Caterina M. J., Leffler A., Malmberg A. B., Martin W. J., Trafton J., Petersen-Zeit K. R., Koltzenburg M., Basbaum A. I., Julius D., Impaired Nociception and Pain Sensation in Mice Lacking the Capsaicin Receptor, *Science* (80-.). 288 (2000) 306–313.
http://science.sciencemag.org/content/288/5464/306.abstract.
- [14] Gunthorpe M. J., Benham C. D., Randall A., Davis J. B., The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels, *Trends Pharmacol. Sci.* 23 (2002) 183–191.
doi:10.1016/S0165-6147(02)01999-5.
- [15] Pintér E., Pozsgai G., Hajna Zs., Helyes Zs., Szolcsányi J., Neuropeptide receptors as potential drug targets in the treatment of inflammatory conditions, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 77 (2014) 5–20. doi:10.1111/bcp.12097.
- [16] Szolcsányi J., Pintér E., Helyes Zs., Oroszi G., Németh J., Systemic anti-inflammatory effect induced by counter-irritation through a local release of somatostatin from nociceptors., *Br. J. Pharmacol.* 125 (1998) 916–922. doi:10.1038/sj.bjp.0702144.
- [17] Szolcsányi J., Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology, *Neuropeptides*. 38 (2004) 377–384. doi:10.1016/j.npep.2004.07.005.
- [18] Z. Helyes, G. Pozsgai, R. Börzsei, J. Németh, T. Bagoly, L. Márk, E. Pintér, G. Tóth, K. Elekes, J. Szolcsányi, D. Reglődi, Inhibitory effect of PACAP-38 on acute neurogenic and non-neurogenic inflammatory processes in the rat, *Peptides*. 28 (2007) 1847–1855.
doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2007.07.001.
- [19] Vaudry D., Falluel-Morel A., Bourgault S., Basille M., Burel D., Wurtz O., Fournier A., Chow B. K. C., H. Hashimoto, Galas L., Vaudry H., Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Its Receptors: 20 Years after the Discovery, *Pharmacol. Rev.* 61 (2009) 283–357.
- [20] L. Dickson, K. Finlayson, VPAC and PAC receptors: From ligands to function, *Pharmacol. Ther.* 121 (2009) 294–316. doi:http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.11.006.
- [21] D. Reglődi, P. Kiss, K. Szabadfi, T. Atlasz, R. Gabriel, G. Horvath, P. Szakaly, B. Sandor, A. Lubics, E. Laszlo, J. Farkas, A. Matkovits, R. Brubel, H. Hashimoto, A. Ferencz, A. Vincze, Z. Helyes, L. Welke, A. Lakatos, A. Tamas, PACAP is an Endogenous Protective Factor—Insights from PACAP-Deficient Mice, *J. Mol. Neurosci.* 48 (2012) 482–492.
doi:10.1007/s12031-012-9762-0.

- [22] A. Tamas, D. Reglodi, O. Farkas, E. Kovesdi, J. Pal, J.T. Povlishock, A. Schwarcz, E. Czeiter, Z. Szanto, T. Doczi, A. Buki, P. Bukovics, Effect of PACAP in Central and Peripheral Nerve Injuries, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 8430–8448. doi:10.3390/ijms13078430.
- [23] J. Németh, D. Reglődi, G. Pozsgai, Á. Szabó, K. Elekes, E. Pintér, J. Szolcsányi, Z. Helyes, Effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 on sensory neuropeptide release and neurogenic inflammation in rats and mice, *Neuroscience*. 143 (2006) 223–230. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.07.028.
- [24] Z. Helyes, Szenzoros neuropeptidok szerepének vizsgálata légúti és ízületi gyulladás, valamint fájdalom állatkísérletes modelljeiben - MTA doktori értekezés., 2009.
- [25] Szolcsányi J., Antidromic vasodilatation and neurogenic inflammation, *Agents Actions*. 23 (1988) 4–11. doi:10.1007/BF01967170.
- [26] Venkatachalam K., M. C., TRP Channels, *Annu. Rev. Biochem.* 76 (2007) 387–417. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819.
- [27] Kaneko Y., S. Á., Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective, *Br. J. Pharmacol.* 171 (2014) 2474–2507. doi:10.1111/bph.12414.
- [28] B. Nilius, G. Owsianik, Transient receptor potential channelopathies, *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 460 (2010) 437–450. doi:10.1007/s00424-010-0788-2.
- [29] Kawarabayashi Y., Hai L., Honda A., Horiuchi S., Tsujioka H., Ichikawa J., Inoue R., Critical role of TRPC1-mediated Ca^{2+} entry in decidualization of human endometrial stromal cells., *Mol. Endocrinol.* 26 (2012) 846–58. doi:10.1210/me.2011-1259.
- [30] Lee G. S., Jeung E. B., Uterine TRPV6 expression during the estrous cycle and pregnancy in a mouse model, *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 293 (2007) E132–E138.
- [31] Yang Y., Degranpré P., Kharfi A., Akoum A., Identification of Macrophage Migration Inhibitory Factor as a Potent Endothelial Cell Growth-Promoting Agent Released by Ectopic Human Endometrial Cells, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85 (2000) 4721–4727. doi:10.1210/jcem.85.12.7003.
- [32] Liu J., Liu X., Duan K., Zhang Y., Guo S.-W., The Expression and Functionality of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 in Ovarian Endometriomas, *Reprod. Sci.* 19 (2012) 1110–1124. doi:10.1177/1933719112443876.
- [33] E. Greaves, K. Grieve, A.W. Horne, P.T.K. Saunders, Elevated Peritoneal Expression and Estrogen Regulation of Nociceptive Ion Channels in Endometriosis, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*

- 99 (2014) E1738–E1743. doi:10.1210/jc.2014-2282.
- [34] Song N., Leng J. H., L.J. H., Expression of transient receptor potentials of vanilloid subtype 1 and pain in endometriosis, *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 47 (2012) 333–336.
 - [35] Hayes P., Meadows H. J., Gunthorpe M. J., Duckworth H. D., Cairns W., Harrison D. C., Clarke C. E., K. Ellington, R.K. Prinjha, Barton A. J. L., Medhurst A. D., Smith G. D., Topp S., Murdock P., Sanger G. J., Terrett J., Jenkins O., Benham C. D., Randall A. D., Gloger I. S., Davis J. B., Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1, *Pain.* 88 (2000) 205–215. doi:10.1016/S0304-3959(00)00353-5.
 - [36] McIntyre P., McLatchie L. M., Chambers A., Phillips E., Clarke M., Savidge J., Toms C., Peacock M., Shah K., Winter J., Weerasakera N., Webb M., Rang H. P., Bevan S., James I. F., Pharmacological differences between the human and rat vanilloid receptor 1 (VR1), *Br. J. Pharmacol.* 132 (2001) 1084–1094. doi:10.1038/sj.bjp.0703918.
 - [37] Brauchi S., Orta G., Mascayano C., Salazar M., Raddatz N., Urbina H., Rosenmann E., Gonzalez-Nilo F., Latorre R., Dissection of the components for PIP(2) activation and thermosensation in TRP channels, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 10246–10251. doi:10.1073/pnas.0703420104.
 - [38] M.-B. V. Y., Stanciu L. A., Serysheva I. I., Tobe B. J., Wensel T. G., Structure of TRPV1 channel revealed by electron cryomicroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 7451–7455. doi:10.1073/pnas.0711835105.
 - [39] Koplas P. A., Rosenberg R. L., Oxford G. S., The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons., *J. Neurosci.* 17 (1997) 3525–3537.
 - [40] Oh U., Hwang S. W., Kim D., Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons., *J. Neurosci.* 16 (1996) 1659–1667.
 - [41] Papakosta M., Dalle C., Haythornthwaite A., Cao L., Stevens E. B., Burgess G., Russell R., Cox P. J., Phillips S. C., Grimm C., The Chimeric Approach Reveals That Differences in the TRPV1 Pore Domain Determine Species-specific Sensitivity to Block of Heat Activation, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 39663–39672. doi:10.1074/jbc.M111.273581.
 - [42] Jordt S. E., Julius D., Molecular Basis for Species-Specific Sensitivity to “Hot” Chili Peppers, *Cell.* 108 (2002) 421–430. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00637-2.
 - [43] Fernandes E. S., Fernandes M. A., Keeble J. E., The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves, *Br. J. Pharmacol.* 166 (2012) 510–521. doi:10.1111/j.1476-

- [44] Starowicz K., Nigam S., D.M. V., Biochemistry and pharmacology of endovanilloids, *Pharmacol. Ther.* 114 (2007) 13–33. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.01.005>.
- [45] Szolcsányi J., Sándor Z., Multimeric TRPV1 nociceptor: a target for analgesics, *Trends Pharmacol. Sci.* 33 (2012) 646–655. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2012.09.002>.
- [46] Docherty R. J., Yeats J. C., Bevan S., Boddeke H.W., Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin-evoked ... from adult rats, *Pflügers Arch.* 431 (1996) 828–837.
- [47] Ryu H., Jin M., Kim S. Y., Choi H., Kang S., Kang D. W., Lee J., Pearce L. V., Pavlyukovets V. A., Morgan A., Tran R., Toth A., Lundberg D. J., Blumberg P. M., Stereospecific High-affinity TRPV1 Antagonists : 2- [4- (methylsulfonylamino) phenyl] propionamide Analogues, *J. Med. Chem.* (2008) 57–67. doi:10.1021/jm701049p.
- [48] Szőke É., Börzsei R., Tóth D. M., Lengi O., Helyes Zs., Sándor Z., Szolcsányi J., Effect of lipid raft disruption on TRPV1 receptor activation of trigeminal sensory neurons and transfected cell line, *Eur. J. Pharmacol.* 628 (2010) 67–74. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.11.052>.
- [49] Szállási Á., Cortright D. N., Blum C. A., Eid S. R., The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept., *Nat. Rev. Drug Discov.* 6 (2007) 357–372. doi:10.1038/nrd2280.
- [50] García-Añoveros J., Nagata K., TRPA1 BT - Transient Receptor Potential (TRP) Channels, in: V. Flockerzi, B. Nilius (Eds.), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2007: pp. 347–362. doi:10.1007/978-3-540-34891-7_21.
- [51] Mihara S., Shibamoto T., The role of flavor and fragrance chemicals in TRPA1 (transient receptor potential cation channel, member A1) activity associated with allergies, *Allergy Asthma. Clin. Immunol.* 11 (2015) 11. doi:10.1186/s13223-015-0074-0.
- [52] Baraldi P. G., Preti D., Materazzi S., Geppetti P., Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) Channel as Emerging Target for Novel Analgesics and Anti-Inflammatory Agents, *J. Med. Chem.* 53 (2010) 5085–5107. doi:10.1021/jm100062h.
- [53] Talavera K., Gees M., Karashima Y., Meseguer V. M., Vanoirbeek J. A. J., Damann N., Everaerts W., Benoit M., Janssens A., Vennekens R., Viana F., Nemery B., Nilius B., V. T., Nicotine activates the chemosensory cation channel TRPA1, *Nat Neurosci.* 12 (2009) 1293–1299. <http://dx.doi.org/10.1038/nn.2379>.

- [54] Jordt S. E., B.D. M., Chuang H., McKemy D. D., Zygmunt P. M., Hogestatt E. D., Meng I. D., Julius D., Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1, *Nature*. 427 (2004) 260–265. <http://dx.doi.org/10.1038/nature02282>.
- [55] Inoue H., Asaka T., Nagata N., Koshihara Y., Mechanism of mustard oil-induced skin inflammation in mice, *Eur. J. Pharmacol.* 333 (1997) 231–240.
doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999\(97\)01040-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999(97)01040-6).
- [56] Bánvölgyi Á., Pozsgai G., Brain S. D., Helyes Zs., Szolcsányi J., Ghosh M., Meleg B., Pintér E., Mustard oil induces a transient receptor potential vanilloid 1 receptor-independent neurogenic inflammation and a non-neurogenic cellular inflammatory component in mice, *Neuroscience*. 125 (2004) 449–459. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.01.009>.
- [57] Hinman A., Chuang H., Bautista D. M., Julius D., TRP channel activation by reversible covalent modification, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 19564–19568.
doi:10.1073/pnas.0609598103.
- [58] Bessac B. F., Jordt S. E., Breathtaking TRP channels: TRPA1 and TRPV1 in airway chemosensation and reflex control., *Physiology (Bethesda)*. 23 (2008) 360–370.
doi:10.1152/physiol.00026.2008.
- [59] Taylor-Clark T. E., McAlexander M. A., Nassenstein C., Sheardown S. A., Wilson S., Thornton J., Carr M. J., Undem B. J., Relative contributions of TRPA1 and TRPV1 channels in the activation of vagal bronchopulmonary C-fibres by the endogenous autacoid 4-oxononenal, *J. Physiol.* 586 (2008) 3447–3459. doi:10.1113/jphysiol.2008.153585.
- [60] Zurborg S., Yurgionas B., Jira J. A., Caspani O., Heppenstall P. A., Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺, *Nat Neurosci.* 10 (2007) 277–279. <http://dx.doi.org/10.1038/nn1843>.
- [61] B. M., Dubin A. E., Petrus M. J., Orth A., Mathur J., Hwang S. W., Patapoutian A., High-throughput random mutagenesis screen reveals TRPM8 residues specifically required for activation by menthol, *Nat Neurosci.* 9 (2006) 493–500. <http://dx.doi.org/10.1038/nn1665>.
- [62] Dai Y., Wang S., Tominaga M., Yamamoto S., Fukuoka T., Higashi T., Kobayashi K., Obata K., Yamanaka H., Noguchi K., Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 1979–1987. doi:10.1172/JCI30951.
- [63] Story G. M., Peier A. M., Reeve A. J., Eid S. R., Mosbacher J., Hricik T. R., Earley T. J., Hergarden A. C., Andersson D. A., Hwang S. W., McIntyre P., Jegla T., Bevan S., Patapoutian A., ANKTM1, a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons, Is Activated by Cold Temperatures, *Cell*. 112 (2003) 819–829. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00158-](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00158-)

2.

- [64] Nagata K., Duggan A., Kumar G., García-Añoveros J., Nociceptor and Hair Cell Transducer Properties of TRPA1, a Channel for Pain and Hearing, *J. Neurosci.* 25 (2005) 4052–4061. doi:10.1523/JNEUROSCI.0013-05.2005.
- [65] Spahn V., Stein C., Zöllner C., Modulation of transient receptor vanilloid 1 activity by transient receptor potential ankyrin 1., *Mol. Pharmacol.* 85 (2014) 335–344. doi:10.1124/mol.113.088997.
- [66] Storti B., Bizzarri R., Cardarelli F., Beltram F., Intact Microtubules Preserve Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) Functionality through Receptor Binding, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 7803–7811. doi:10.1074/jbc.M111.332296.
- [67] Kobayashi K., Fukuoka T., Obata K., Yamanaka H., Dai Y., Tokunaga A., Noguchi K., Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with a δ /c-fibers and colocalization with trk receptors, *J. Comp. Neurol.* 493 (2005) 596–606. doi:10.1002/cne.20794.
- [68] Fernandes E. S., Fernandes M. A., Keeble J. E., The functions of TRPA1 and TRPV1: Moving away from sensory nerves, *Br. J. Pharmacol.* 166 (2012) 510–521. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01851.x.
- [69] Caterina M. J., Chemical biology: Sticky spices, *Nature.* 445 (2007) 491–492. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05565>.
- [70] Holzer P., Capsaicin : Cellular Selectivity Targets , for Thin Mechanisms of Action , Sensory Neurons, *Pharmacol. Rev.* 43 (1991) 143–201.
- [71] Kark T., Bagi Zs., Lizanecz E., Pásztor E. T., Erdei N., Czikora Á., Papp Z., Édes I., Pórszász R., Tóth A., Tissue-specific regulation of microvascular diameter: opposite functional roles of neuronal and smooth muscle located vanilloid receptor-1., *Mol. Pharmacol.* 73 (2008) 1405–1412. doi:10.1124/mol.107.043323.
- [72] Szállási Á., Vanilloid (Capsaicin) Receptors in Health and Disease, *Am. J. Clin. Pathol.* 118 (2002) 110–121. <http://ajcp.oxfordjournals.org/content/118/1/110.abstract>.
- [73] Á. Czikora, E. Lizanecz, P. Bakó, I. Rutkai, F. Ruzsnavszky, J. Magyar, R. Pórszász, T. Kark, A. Facskó, Z. Papp, I. Édes, A. Tóth, Structure-activity relationships of vanilloid receptor agonists for arteriolar TRPV1, *Br. J. Pharmacol.* 165 (2012) 1801–1812. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01645.x.

- [74] M.D. Southall, T. Li, L.S. Gharibova, Y. Pei, G.D. Nicol, J.B. Travers, Activation of Epidermal Vanilloid Receptor-1 Induces Release of Proinflammatory Mediators in Human Keratinocytes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* . 304 (2003) 217–222. doi:10.1124/jpet.102.040675.
- [75] S. Bertin, Y. Aoki-Nonaka, P.R. de Jong, L.L. Nohara, H. Xu, S.R. Stanwood, S. Srikanth, J. Lee, K. To, L. Abramson, T. Yu, T. Han, R. Touma, X. Li, J.M. González-Navajas, S. Herdman, M. Corr, G. Fu, H. Dong, Y. Gwack, A. Franco, W.A. Jefferies, E. Raz, The ion channel TRPV1 regulates the activation and proinflammatory properties of CD4(+) T cells, *Nat. Immunol.* 15 (2014) 1055–1063. doi:10.1038/ni.3009.
- [76] Bíró T., Maurer M., Modarres S., Lewin N. E., Brodie C., Ács G., Ács P., Paus R., Blumberg P. M., Characterization of Functional Vanilloid Receptors Expressed by Mast Cells, *Blood*. 91 (1998) 1332–1340.
- [77] J. Liu, X. Liu, K. Duan, Y. Zhang, S.-W. Guo, The Expression and Functionality of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 in Ovarian Endometriomas, *Reprod. Sci.* . 19 (2012) 1110–1124. doi:10.1177/1933719112443876.
- [78] Obata K., Katsura H., Mizushima T., Yamanaka H., K. K., Dai Y., Fukuoka T., Tokunaga A., Tominaga M., Noguchi K., TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 2393–2401. doi:10.1172/JCI25437.
- [79] Kondo T., Obata K., Miyoshi K., Sakurai J., Tanaka J., Miwa H., Noguchi K., Transient receptor potential A1 mediates gastric distention-induced visceral pain in rats., *Gut*. 58 (2009) 1342–52. doi:10.1136/gut.2008.175901.
- [80] Du S., A. I., Yoshiyama M., Nomura T., Takeda M., Transient Receptor Potential Channel A1 Involved in Sensory Transduction of Rat Urinary Bladder Through C-Fiber Pathway, *Urology*. 70 (2007) 826–831. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.urology.2007.06.1110.
- [81] Greaves E., Grieve K., Horne A. W., Saunders P. T., Elevated peritoneal expression and estrogen regulation of nociceptive ion channels in endometriosis., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99 (2014) jc20142282. doi:10.1210/jc.2014-2282.
- [82] Bautista D. M., Pellegrino M., Tsunozaki M., TRPA1: A Gatekeeper for Inflammation, *Annu. Rev. Physiol.* 75 (2013) 181–200. doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183811.
- [83] Assas B. M., M.J. A., Pennock J. L., Cross-talk between neural and immune receptors provides a potential mechanism of homeostatic regulation in the gut mucosa, *Mucosal Immunol.* 7 (2014) 1283–1289. doi:10.1038/mi.2014.80.

- [84] Denda S., Denda M., Inoue K., Hibino T., Glycolic acid induces keratinocyte proliferation in a skin equivalent model via TRPV1 activation, *J. Dermatol. Sci.* 57 (2010) 108–113.
doi:10.1016/j.jdermsci.2009.11.007.
- [85] Andrade E. L., Meotti F. C., Calixto J. B., TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs, *Pharmacol. Ther.* 133 (2012) 189–204. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.10.008.
- [86] Miyata A., Arimura A., Dahl R. R., Minamino N., Uehara A., Jiang L., Culler M. D., Coy D. H., Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164 (1989) 567–574.
doi:http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X(89)91757-9.
- [87] L. M., Couvineau A., Tan V., Class II G protein-coupled receptors for VIP and PACAP: Structure, models of activation and pharmacology, *Peptides*. 28 (2007) 1631–1639.
doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2007.04.026.
- [88] Arimura A., Somogyvári-Vigh A., Miyata A., Mizuno K., Coy D. H., Kitada C., Tissue Distribution of PACAP as Determined by RIA: Highly Abundant in the Rat Brain and Testes, *Endocrinology*. 129 (1991) 2787–2789. doi:10.1210/endo-129-5-2787.
- [89] Hosoya M., Kimura C., Ogi K., Ohkubo S., Miyamoto Y., Kugoh H., Shimizu M., Onda H., Oshimura M., Arimura A., Fujino M., Structure of the human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene, *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1129 (1992) 199–206. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0167-4781(92)90488-L.
- [90] Arimura A., Perspectives on Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) in the Neuroendocrine, Endocrine, and Nervous Systems, *Jpn. J. Physiol.* 48 (1998) 301–331.
doi:10.2170/jjphysiol.48.301.
- [91] Moller K., Zhang Y. Z., Håkanson R., Luts A., Sjölund B., Uddman R., Sundler F., Pituitary adenylate cyclase activating peptide is a sensory neuropeptide: Immunocytochemical and immunochemical evidence, *Neuroscience*. 57 (1993) 725–732.
doi:http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522(93)90018-B.
- [92] Mulder H., Uddman R., Moller K., Zhang Y.-Z., Ekblad E., Alumets J., Sundler F., Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide expression in sensory neurons, *Neuroscience*. 63 (1994) 307–312. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522(94)90025-6.
- [93] Cardell L. O., Uddman R., Luts A., Sundler F., Pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) in guinea-pig lung: distribution and dilatory effects, *Regul. Pept.* 36 (1991) 379–390.
doi:10.1016/0167-0115(91)90071-N.

- [94] Uddman R., Luts A., Arimura A., Sundler F., Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide (PACAP), a new vasoactive intestinal peptide (VIP) -like peptide in the respiratory tract ., *Cell Tissue Res.* 265 (1991) 197–201.
- [95] Kinhult J., Andersson J. A., Uddman R., Stjarne P., Cardell L. O., Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide 38 a potent endogenously produced dilator of human airways, *Eur. Respir. J.* 15 (2000) 243–247.
- [96] Szántó Z., Z. Sárszegi, Reglődi D., Németh J., Szabadfi K., Kiss P., Varga A., Bánki E., Csanaky K., Gaszner B., Pintér O., Szalai Zs., Tamás A., PACAP Immunoreactivity in Human Malignant Tumor Samples and Cardiac Diseases, *J. Mol. Neurosci.* 48 (2012) 667–673. doi:10.1007/s12031-012-9815-4.
- [97] Hernández M., Barahona M. V., Recio P., Benedito S., Martínez A. C., Rivera L., García-Sacristán A., Prieto D., Orensanz L. M., Neuronal and smooth muscle receptors involved in the PACAP- and VIP-induced relaxations of the pig urinary bladder neck, *Br. J. Pharmacol.* 149 (2006) 100–109. doi:10.1038/sj.bjp.0706832.
- [98] Sakurai Y., Shintani N., Hayata A., Hashimoto H., Baba A., Trophic Effects of PACAP on Pancreatic Islets: A Mini-Review, *J. Mol. Neurosci.* 43 (2011) 3–7. doi:10.1007/s12031-010-9424-z.
- [99] Köves K., Arimura A., Vigh S., S.-V. A., Miller J., Immunohistochemical localization of PACAP in the ovine digestive system, *Peptides.* 14 (1993) 449–455. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0196-9781(93)90131-Y.
- [100] Mirabella N., Squillacioti C., Colitti M., Germano G., Pelagalli A., G. Paino, Pituitary adenylyl cyclase activating peptide (PACAP) immunoreactivity and mRNA expression in the duck gastrointestinal tract, *Cell Tissue Res.* 308 (2002) 347–359. doi:10.1007/s00441-002-0555-6.
- [101] Tobin G., Asztély A., Edwards A. V., Ekström J., Håkanson R., Sundler F., Presence and effects of pituitary adenylyl cyclase activating peptide in the submandibular gland of the ferret, *Neuroscience.* 66 (1995) 227–235. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522(94)00622-C.
- [102] Z. Pirger, J. Nemeth, L. Hiripi, G. Toth, P. Kiss, A. Lubics, A. Tamas, L. Hernadi, T. Kiss, D. Reglodi, PACAP Has Anti-apoptotic Effect in the Salivary Gland of an Invertebrate Species, *Helix pomatia*, *J. Mol. Neurosci.* 36 (2008) 105–114. doi:10.1007/s12031-008-9070-x.
- [103] Tornøe K., Hannibal J., Jensen T. B., Georg B., Rickelt L. F., Andreasen M. B., Fahrenkrug J.,

- Holst J. J., PACAP-(1–38) as neurotransmitter in the porcine adrenal glands, *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 279 (2000) E1413–E1425.
- [104] García-Fernández M., Collado B., Bodega G., Cortés J., Ruíz-Villaespesa A., Carmena M., Prieto J. C., Pituitary adenylate cyclase-activating peptide/vasoactive intestinal peptide receptors in human normal mammary gland and breast cancer tissue, *Gynecol. Endocrinol.* 20 (2005) 327–333. doi:10.1080/09513590500098240.
- [105] Skakkebaek M., Hannibal J., Fahrenkrug J., Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the rat mammary gland., *Cell Tissue Res.* 298 (1999) 153–159.
- [106] Czeglédi L., Tamás A., Börzsei R., Bagoly T., Kiss P., Horváth G., Brubel R., Németh J., Szalontai B., Szabadfi K., Jávora A., Reglődi D., Helyes Zs., Presence of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the plasma and milk of ruminant animals, *Gen. Comp. Endocrinol.* 172 (2011) 115–119. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.12.012.
- [107] Gray S. L., Yamaguchi N., Vencová P., Sherwood N. M., Temperature-Sensitive Phenotype in Mice Lacking Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide, *Endocrinology.* 143 (2002) 3946–3954. doi:10.1210/en.2002-220401.
- [108] Matsuda K., Maruyama K., Nakamatsi T., Miura T., S. S., Effects of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Vasoactive Intestinal Polypeptide on Food Intake and Locomotor Activity in the Goldfish, *Carassius auratus*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1070 (2006) 417–421. doi:10.1196/annals.1317.054.
- [109] Murck H., Steiger A., Frieboes R. M., Antonijevic I. A., Pituitary adenylate cyclase-activating peptide affects homeostatic sleep regulation in healthy young men, *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 292 (2007) E853–E857.
- [110] Uchida D., Arimura A., Somogyvári-Vigh A., Shioda S., Banks W. A., Prevention of ischemia-induced death of hippocampal neurons by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, *Brain Res.* 736 (1996) 280–286. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(96)00716-0.
- [111] Farkas O., Tamás A., Zsombok A., Reglődi D., Pál J., Büki A., Lengvári I., Povlishock J. T., Dóczi T., Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in a rat model of traumatic brain injury, *Regul. Pept.* 123 (2004) 69–75. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.regpep.2004.05.014.
- [112] Reglődi D., Tamás A., Lubics A., Szalontay L., Lengvári I., Morphological and functional effects of PACAP in 6-hydroxydopamine-induced lesion of the substantia nigra in rats, *Regul. Pept.* 123 (2004) 85–94. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.regpep.2004.05.016.

- [113] Tamás A., Lubics A., Lengvári I., R. D., Protective Effects of PACAP in Excitotoxic Striatal Lesion, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1070 (2006) 570–574. doi:10.1196/annals.1317.083.
- [114] Lee J., Park H. J., Choi H. S., Kwon H. B., Arimura A., Lee B. J., Choi W. S., Chun S. Y., Gonadotropin Stimulation of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Messenger Ribonucleic Acid in the Rat Ovary and the Role of PACAP as a Follicle Survival Factor, *Endocrinology*. 140 (1999) 818–826. doi:10.1210/endo.140.2.6485.
- [115] Delgado M., Ganea D., Vasoactive Intestinal Peptide and Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Inhibit Expression of Fas Ligand in Activated T Lymphocytes by Regulating c-Myc, NF- κ B, NF-AT, and Early Growth Factors 2/3, *J. Immunol.* 166 (2001) 1028–1040.
- [116] Masmoudi-Kouki O., Douiri S., Hamdi Y., Kaddour H., Bahdoudi S., Vaudry D., Basille M., Leprince J., Fournier A., Vaudry H., Tonon M. C., Amri M., Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects astroglial cells against oxidative stress-induced apoptosis, *J. Neurochem.* 117 (2011) 403–411. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07185.x.
- [117] Ishihara T., Shigemoto R., Mori K., Takahashi K., Nagata S., Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide, *Neuron*. 8 (1992) 811–819. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0896-6273(92)90101-I.
- [118] Lutz E. M., Sheward W. J., West K. M., Morrow J. A., Fink G., Harmar A. J., The VIP2 receptor: Molecular characterisation of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide, *FEBS Lett.* 334 (1993) 3–8. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(93)81668-P.
- [119] Vaudry D., Gonzalez B. J., Basille M., Yon L., Fournier A., Vaudry H., Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: From structure to functions, *Pharmacol. Rev.* 52 (2000) 269–324.
- [120] Bourgault S., Chatenet D., Wurtz O., Doan N. D., Leprince J., Vaudry H., Vaudry A., Fournier D., Strategies to Convert PACAP from a Hypophysiotropic Neurohormone Into a Neuroprotective Drug, *Curr. Pharm. Des.* 17 (2011) 1002–1024. doi:http://dx.doi.org/10.2174/138161211795589337.
- [121] Usdin T. B., Bonner T. I., Mezey E., Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions., *Endocrinology*. 135 (1994) 2662–2680. doi:10.1210/endo.135.6.7988457.
- [122] Filipsson K., Sundler F., Hannibal J., Ahrén B., PACAP and PACAP receptors in insulin

- producing tissues: localization and effects, *Regul. Pept.* 74 (1998) 167–175.
doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0167-0115\(98\)00037-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-0115(98)00037-8).
- [123] Börzsei R., Márk L., Tamás A., Bagoly T., Bay Cs., Csanaky K., Bánki E., Kiss P., Váczy A., Horváth G., Németh J., Szauer E., Helyes Zs., Reglődi D., Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 in human plasma and milk, *Eur. J. Endocrinol.* 160 (2009) 561–565.
 - [124] Brubel R., Reglődi D., Jámbo E., Koppán M., Várnagy A., Bíró Z., Kiss P., Gaál V., Matkovits A., Farkas J., Lubics A., Bódis J., Bay C., Veszprémi B., Tamás A., Németh J., Márk L., Investigation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in human gynecological and other biological fluids by using MALDI TOF mass spectrometry ., (n.d.) 23–24. doi:10.1002/jms.1884.
 - [125] Csanaky K., Doppler W., Tamás A., Kovács K., Tóth G., Reglődi D., Influence of Terminal Differentiation and PACAP on the Cytokine, Chemokine, and Growth Factor Secretion of Mammary Epithelial Cells, *J. Mol. Neurosci.* 52 (2014) 28–36. doi:10.1007/s12031-013-0193-3.
 - [126] Brubel R., Boronkai A., Reglődi D., Rácz B., Németh J., Kiss P., Lubics A., Tóth G., Horváth G., Varga T., Szőgyi D., Fónagy E., Farkas J., Barakonyi A., Bellyei Sz., Szereday L., Koppán M., Tamás A., Changes in the Expression of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide in the Human Placenta during Pregnancy and Its Effects on the Survival of JAR Choriocarcinoma Cells, *J. Mol. Neurosci.* 42 (2010) 450–458. doi:10.1007/s12031-010-9374-5.
 - [127] Koch Y., Werner H., Fridkin M., Hypothalamic hormones in milk., *Endocr. Regul.* 25 (1991) 128–133.
 - [128] Grosvernor C. E., Picciano M. F., Baumrucker C. R., Hormones and Growth Factors in Milk, *Endocr. Rev.* 14 (1993) 710–728. doi:10.1210/edrv-14-6-710.
 - [129] Kelly G. S., Bovine colostrum: A review of clinical uses, *Altern. Med. Rev.* 8 (2003) 378.
 - [130] Schlimme E., Martin D., Meisel H., Nucleosides and nucleotides : natural bioactive substances in milk and colostrum ., *Br J Nutr.* 84 (2000) 59–68.
 - [131] Cohick W. S., Role of the Insulin-like Growth Factors and Their Binding Proteins in Lactation, *J. Dairy Sci.* 81 (1998) 1769–1777. doi:[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75746-7](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75746-7).
 - [132] Lu N., DiCicco-Bloom E., Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is an autocrine inhibitor of mitosis in cultured cortical precursor cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94

- (1997) 3357–3362.
- [133] Jarmołowska B., Sidor K., Iwan M., Bielikowicz K., Kaczmarowski M., Kostyra E., Kostyra H., Changes of β -casomorphin content in human milk during lactation, *Peptides*. 28 (2007) 1982–1986. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2007.08.002>.
 - [134] Eilers E., Ziska T., Harder T., Plagemann A., Obladen M., Loui A., Leptin determination in colostrum and early human milk from mothers of preterm and term infants, *Early Hum. Dev.* 87 (2011) 415–419. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2011.03.004>.
 - [135] J.C. Arévalo, S.H. Wu, Neurotrophin signaling: many exciting surprises!, *Cell. Mol. Life Sci. C*. 63 (2006) 1523–1537. doi:[10.1007/s00018-006-6010-1](https://doi.org/10.1007/s00018-006-6010-1).
 - [136] Pellegrini G., Magistretti P. J., Martin J. L., VIP and PACAP potentiate the action of glutamate on BDNF expression in mouse cortical neurones, *Eur. J. Neurosci.* 10 (1998) 272–280. doi:[10.1046/j.1460-9568.1998.00052.x](https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00052.x).
 - [137] Müller D., Davidoff M. S., Bargheer O., Paust H. J., Pusch W., Koeva Y., Ježek D., Holstein A. F., Middendorff R., The expression of neurotrophins and their receptors in the prenatal and adult human testis: evidence for functions in Leydig cells, *Histochem. Cell Biol.* 126 (2006) 199–211. doi:[10.1007/s00418-006-0155-8](https://doi.org/10.1007/s00418-006-0155-8).
 - [138] Caroleo M. C., Carito V., Pingitore A., Perrotta I. D., Perri M., Mancuso D., Russo A., Cione E., Human kidney podocyte cell population as a novel biological target of nerve growth factor, *Growth Factors*. 33 (2015) 14–22. doi:[10.3109/08977194.2014.975799](https://doi.org/10.3109/08977194.2014.975799).
 - [139] Sariola H., The neurotrophic factors in non-neuronal tissues, *Cell. Mol. Life Sci. C*. 58 (2001) 1061–1066. doi:[10.1007/PL00000921](https://doi.org/10.1007/PL00000921).
 - [140] Frechilla D., García-Osta A., Palacios S., Cenarruzabeitia E., Del Río J., BDNF mediates the neuroprotective effect of PACAP-38 on rat cortical neurons, *Neuroreport*. 12 (2001).
 - [141] Hammack S. E., Cheung J., Rhodes K. M., Schutz K. C., Falls W. A., Braas K. M., May V., Chronic stress increases pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST): roles for PACAP in anxiety-like behavior, *Psychoneuroendocrinology*. 34 (2009) 833–843. doi:[10.1016/j.psyneuen.2008.12.013](https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.12.013).
 - [142] Ogata K., Shintani N., Hayata-Takano A., Kamo T., Higashi S., Seiriki K., Momosaki H., Vaudry D., Vaudry H., L. Galas, A. Kasai, K. Nagayasu, T. Nakazawa, R. Hashimoto, Y. Ago, T. Matsuda, A. Baba, H. Hashimoto, PACAP Enhances Axon Outgrowth in Cultured

- Hippocampal Neurons to a Comparable Extent as BDNF, PLoS One. 10 (2015) e0120526. doi:10.1371/journal.pone.0120526.
- [143] O.M. Fischer, S. Hart, A. Gschwind, A. Ullrich, EGFR signal transactivation in cancer cells, *Biochem. Soc. Trans.* 31 (2003) 1203 LP-1208.
- [144] A. Riccio, B.A. Pierchala, C.L. Ciarallo, D.D. Ginty, An NGF-TrkA-Mediated Retrograde Signal to Transcription Factor CREB in Sympathetic Neurons, *Science* (80-.). 277 (1997) 1097 LP-1100.
- [145] R. Rajagopal, Z.-Y. Chen, F.S. Lee, M. V Chao, Transactivation of Trk Neurotrophin Receptors by G-Protein-Coupled Receptor Ligands Occurs on Intracellular Membranes, *J. Neurosci.* 24 (2004) 6650 LP-6658.
- [146] F.S. Lee, R. Rajagopal, A.H. Kim, P.C. Chang, M. V Chao, Activation of Trk Neurotrophin Receptor Signaling by Pituitary Adenylate Cyclase-activating Polypeptides, *J. Biol. Chem.* . 277 (2002) 9096–9102. doi:10.1074/jbc.M107421200.
- [147] Y. Kondo, J. Saruta, M. To, N. Shiiki, C. Sato, K. Tsukinoki, Expression and Role of the BDNF Receptor-TrkB in Rat Adrenal Gland under Acute Immobilization Stress, *ACTA Histochem. Cytochem.* 43 (2010) 139–147. doi:10.1267/ahc.10027.
- [148] A. Avelino, F. Cruz, J.N. Panicker, M.D. Liechti, Basic Principles BT - Practical Functional Urology, in: J. Heesakkers, C. Chapple, D. De Ridder, F. Farag (Eds.), Springer International Publishing, Cham, 2016: pp. 1–17. doi:10.1007/978-3-319-25430-2_1.
- [149] M.A. Al-Qudah, A. Al-Dwairi, Mechanisms and regulation of neurotrophin synthesis and secretion, *Neurosciences.* 21 (2016) 306–313. doi:10.17712/nsj.2016.4.20160080.
- [150] Bloom B. R., Bennett B., Mechanism of a Reaction in Vitro Associated with Delayed-Type Hypersensitivity, *Science* (80-.). 153 (1966) 80–82.
- [151] David J. R., Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 56 (1966) 72–77. doi:10.1073/pnas.56.1.72.
- [152] Nathan C. F., Karnovsky M. L., David J. R., ALTERATIONS OF MACROPHAGE FUNCTIONS BY MEDIATORS FROM LYMPHOCYTES, *J. Exp. Med.* 133 (1971) 1356–1376.
- [153] Weiser W. Y., Temple P. A., Witek-Giannotti J. S., Remold H. G., Clark S. C., David J. R., Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor.,

- Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86 (1989) 7522–7526.
- [154] Bernhagen J., Calandra T., Bucala R., Regulation of the immune response by macrophage migration inhibitory factor: biological and structural features, *J Mol Med.* 76 (1998) 151–161.
 - [155] Suzuki M., Sugimoto H., Nakagawa A., Tanaka I., Nishihira J., Sakai M., Crystal structure of the macrophage migration inhibitory factor from rat liver, *Nat Struct Mol Biol.* 3 (1996) 259–266.
 - [156] Sun H. W., Bernhagen J., Bucala R., Lolis E., Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 5191–5196.
 - [157] Calandra T., Roger T., Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity, *Nat Rev Immunol.* 3 (2003) 791–800. <http://dx.doi.org/10.1038/nri1200>.
 - [158] Leng L., Bucala R., Insight into the biology of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) revealed by the cloning of its cell surface receptor, *Cell Res.* 16 (n.d.) 162–168. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cr.7310022>.
 - [159] Jüttner J., Bernhagen C. N., Metz C. N., Röllinghoff M., Bucala R., Gessner A., Migration Inhibitory Factor Induces Killing Migration Inhibitory Factor Induces Killing of *Leishmania* major by Macrophages: Dependence on Reactive Nitrogen Intermediates and Endogenous TNF- α 1, *J Immunol Ref.* 161 (1998) 2383–2390.
 - [160] Bacher M., Metz C. N., Calandra T., Mayer K., Chesney J., Lohoff M., Gerns D., Donnelly T., Bucala R., An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 7849–7854.
 - [161] Bernhagen J., Mitchell R. A., Calandra T., Voelter W., Cerami A., Bucala R., Purification, Bioactivity, and Secondary Structure Analysis of Mouse and Human Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF), *Biochemistry.* 33 (1994) 14144–14155. doi:10.1021/bi00251a025.
 - [162] Kleemann R., Hausser A., Geiger G., Mischke R., Burger-Kentischer A., Flieger O., Johannes F. J., Roger T., Calandra T., Kapurniotu A., Grell M., Finkelmeier D., Brunner H., Bernhagen J., Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1, *Nature.* 408 (2000) 211–216. <http://dx.doi.org/10.1038/35041591>.
 - [163] Bernhagen J., Calandra T., Mitchell R. A., Martin S. B., Tracey K. J., Voelter W., Manogue K. R., Cerami A., Bucala R., MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia, *Nature.* 365 (1993) 756–759. <http://dx.doi.org/10.1038/365756a0>.
 - [164] Calandra T., Spiegel L. A., Metz C. N., Bucala R., Macrophage migration inhibitory factor is a

- critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 11383–11388.
- [165] Bernhagen J., Bacher M., Calandra T., Metz C. N., Doty S. B., Donnelly T., Bucala R., An essential role for macrophage migration inhibitory factor in the tuberculin delayed-type hypersensitivity reaction, *J. Exp. Med.* 183 (1996) 277–282.
- [166] Lan H. Y., Bacher M., Yang N., Mu W., Nikolic-Paterson D. J., Metz C., Meinhardt A., Bucala R., Atkins R. C., The Pathogenic Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Immunologically Induced Kidney Disease in the Rat, *J. Exp. Med.* 185 (1997) 1455–1466.
- [167] Leech M., Metz C. N., Bucala R., Morand E. F., Regulation of macrophage migration inhibitory factor by endogenous glucocorticoids in rat adjuvant-induced arthritis, *Arthritis Rheum.* 43 (2000) 827–833. doi:10.1002/1529-0131(200004)43:4<827::AID-ANR13>3.0.CO;2-K.
- [168] Hou G., Valujskikh A., Bayer J., Stavitsky A. B., Metz C., Heeger P. S., In vivo blockade of macrophage migration inhibitory factor prevents skin graft destruction after indirect allorecognition, *Transplantation.* 72 (2001) 1890–1897.
- [169] de Jong Y. P., Abadia-Molina A. C., Satoskar A. R., Clarke K., Rietdijk S. T., Faubion W. A., Mizoguchi E., Metz C. N., Sahli M. A., ten Hove T., Keates A. C., Lubetsky J. B., Farrell R. J., Michetti P., van Deventer S. J., Lolis E., David J. R., Bhan A. K., Terhorst C., Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF, *Nat Immunol.* 2 (2001) 1061–1066. <http://dx.doi.org/10.1038/ni720>.
- [170] Lai K. N., Leung J. C. K., Metz C. N., Lai F. M., Bucala R., Lan H. Y., Role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome, *J. Pathol.* 199 (2003) 496–508. doi:10.1002/path.1291.
- [171] Lan M., Chang Y., Chen W., Tseng Y., Lin H., Lai S., Liu J., Association between MIF gene polymorphisms and carotid artery atherosclerosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 435 (2013) 319–322. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.02.129.
- [172] Awandare G. A., Martinson J. J., Were T., Ouma C., Davenport G. C., Ong'echa J. M., Wang W., Leng L., Ferrell R. E., Bucala R., Perkins D. J., MIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor) Promoter Polymorphisms and Susceptibility to Severe Malarial Anemia, *J. Infect. Dis.* 200 (2009) 629–637.
- [173] Denking C. M., Denking M., Kort J. J., Metz C., Forsthuber T. G., In Vivo Blockade of Macrophage Migration Inhibitory Factor Ameliorates Acute Experimental Autoimmune

- Encephalomyelitis by Impairing the Homing of Encephalitogenic T Cells to the Central Nervous System, *J. Immunol.* 170 (2003) 1274–1282.
- [174] Ogawa H., Nishihira J., Sato Y., Kondo M., Takahashi N., Oshima T., Todo S., AN ANTIBODY FOR MACROPHAGE MIGRATION INHIBITORY FACTOR SUPPRESSES TUMOUR GROWTH AND INHIBITS TUMOUR-ASSOCIATED ANGIOGENESIS, *Cytokine*. 12 (2000) 309–314. doi:<http://dx.doi.org/10.1006/cyto.1999.0562>.
- [175] Akoum A., Metz C. N., Al-Akoum M., Kats R., Macrophage migration inhibitory factor expression in the intrauterine endometrium of women with endometriosis varies with disease stage, infertility status, and pelvic pain, *Fertil. Steril.* 85 (2006) 1379–1385. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.10.073>.
- [176] Lang T., Foote A., Lee J. P. W., Morand E. F., Harris J., MIF: Implications in the Pathoetiology of Systemic Lupus Erythematosus, *Front. Immunol.* 6 (2015) 577. doi:[10.3389/fimmu.2015.00577](https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00577).
- [177] Rosengren E., Åman P., Thelin S., H.C.A. S., Björk P., Jacobsson L., Rorsman H., The macrophage migration inhibitory factor MIF is a phenylpyruvate tautomerase, *FEBS Lett.* 417 (1997) 85–88. doi:[10.1016/S0014-5793\(97\)01261-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01261-1).
- [178] Eskanzi B., Warner M. L., Epidemiology of endometriosis., *Obs. Gynecol Clin North Am.* 24 (1997) 235–258. doi:[10.1136/jech.47.2.84](https://doi.org/10.1136/jech.47.2.84).
- [179] Birnbaum L. S., Cummings A. M., Dioxins and endometriosis: a plausible hypothesis., *Environ. Health Perspect.* 110 (2002) 15–21.
- [180] Tinneberg H. R., Tuttlies F., Berkes E., K.G. A., Hackethal A., Konrad L., Oehmke F., Classification of Endometriosis, in: T. Harada (Ed.), *Endometr. Pathog. Treat.*, Springer Japan, Tokyo, 2014: pp. 341–362. doi:[10.1007/978-4-431-54421-0_21](https://doi.org/10.1007/978-4-431-54421-0_21).
- [181] Sampson J. A., Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 14 (1927) 422–469. doi:[10.1016/S0002-9378\(15\)30003-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(15)30003-X).
- [182] LIU D. T. Y., H. A., Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology, *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* 93 (1986) 859–862. doi:[10.1111/j.1471-0528.1986.tb07995.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1986.tb07995.x).
- [183] Burney R. O., G.L. C., Pathogenesis and Pathophysiology of Endometriosis, *Fertil. Steril.* 98 (2012) 10.1016/j.fertnstert.2012.06.029. doi:[10.1016/j.fertnstert.2012.06.029](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.06.029).

- [184] L. G., NORMANN P., THE PATHOGENESIS OF ENDOMETRIOSIS, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 34 (1955) 366–398. doi:10.3109/00016345509158287.
- [185] Wheeler J. M., Epidemiology and prevalence of endometriosis, *Infertil. Reprod.* 3 (1992) 545–549.
- [186] Alkatout I., Mettler L., Beteta C., Hedderich J., Jonat W., Schollmeyer T., Salmassi A., Combined Surgical and Hormone Therapy for Endometriosis is the Most Effective Treatment: Prospective, Randomized, Controlled Trial, *J. Minim. Invasive Gynecol.* 20 (2013) 473–481. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jmig.2013.01.019.
- [187] Matorras R., Elorriaga M. A., Pijoan J. I., Ramón O., Rodríguez-Escudero F. J., Recurrence of endometriosis in women with bilateral adnexectomy (with or without total hysterectomy) who received hormone replacement therapy, *Fertil. Steril.* 77 (2002) 303–308. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(01)02981-8.
- [188] Prentice A., Endometriosis, *BMJ Br. Med. J.* 323 (2001) 93–95.
- [189] J. Garai, J.H. Clark, Tyrosinase-like activity and estradiol binding in rat uterine nuclear extracts, *Steroids.* 57 (1992) 248–256. doi:https://doi.org/10.1016/0039-128X(92)90110-U.
- [190] J.L. Környei, A. Oszter, K.A. Kovács, Z. Vértes, K.M. Komlósi, P.M. Göcze, M. Vértes, Anti-mitogenic action of opioid peptides on epidermal growth factor-stimulated uterine cells, *Eur. J. Pharmacol.* 414 (2001) 155–163. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999(01)00790-7.
- [191] A.E. Herbison, Rapid actions of oestrogen on gonadotropin-releasing hormone neurons; from fantasy to physiology?, *J. Physiol.* 587 (2009) 5025–5030. doi:10.1113/jphysiol.2009.179838.
- [192] T. Barkhem, B. Carlsson, Y. Nilsson, E. Enmark, J.-Å. Gustafsson, S. Nilsson, Differential Response of Estrogen Receptor α and Estrogen Receptor β to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, *Mol. Pharmacol.* 54 (1998) 105 LP-112. http://molpharm.aspetjournals.org/content/54/1/105.abstract.
- [193] M.W. Pfaffl, M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR., *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45.
- [194] J. Kun, Z. Helyes, A. Perkecz, Á. Bán, B. Polgár, J. Szolcsányi, E. Pintér, Effect of Surgical and Chemical Sensory Denervation on Non-neural Expression of the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) Receptors in the Rat, *J. Mol. Neurosci.* 48 (2012) 795–803. doi:10.1007/s12031-012-9766-9.
- [195] I. Potolicchio, L. Santambrogio, J.L. Strominger, Molecular Interaction and Enzymatic Activity

- of Macrophage Migration Inhibitory Factor with Immunorelevant Peptides, *J. Biol. Chem.* . 278 (2003) 30889–30895. doi:10.1074/jbc.M302854200.
- [196] B. Jakab, D. Reglődi, R. Józsa, T. Hollósy, A. Tamás, A. Lubics, I. Lengvári, G. Oroszi, Z. Szilvássy, J. Szolcsányi, J. Németh, Distribution of PACAP-38 in the central nervous system of various species determined by a novel radioimmunoassay, *J. Biochem. Biophys. Methods.* 61 (2004) 189–198. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jbbm.2004.03.002.
- [197] R.K. Das, S. Banerjee, B.H. Shapiro, Extensive Sex- and/or Hormone-Dependent Expression of Rat Housekeeping Genes, *Endocr. Res.* 38 (2013) 105–111. doi:10.3109/07435800.2012.723294.
- [198] Srisuparp S., Strakova Z., Fazleabas A. T., The Role of Chorionic Gonadotropin (CG) in Blastocyst Implantation, *Arch. Med. Res.* 32 (2001) 627–634. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0188-4409(01)00330-7.
- [199] von Wolff M., Thaler C. J., Strowitzki T., Broome J., Stolz W., Tabibzadeh S., Regulated expression of cytokines in human endometrium throughout the menstrual cycle: dysregulation in habitual abortion, *Mol. Hum. Reprod.* 6 (2000) 627–634.
- [200] C.R. McNamara, J. Mandel-Brehm, D.M. Bautista, J. Siemens, K.L. Deranian, M. Zhao, N.J. Hayward, J.A. Chong, D. Julius, M.M. Moran, C.M. Fanger, TRPA1 mediates formalin-induced pain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 13525–13530. doi:10.1073/pnas.0705924104.
- [201] É. Sághy, É. Szőke, M. Payrits, Z. Helyes, R. Börzsei, J. Erostyák, T.Z. Jánosi, G. Sétáló Jr, J. Szolcsányi, Evidence for the role of lipid rafts and sphingomyelin in Ca²⁺-gating of Transient Receptor Potential channels in trigeminal sensory neurons and peripheral nerve terminals, *Pharmacol. Res.* 100 (2015) 101–116. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2015.07.028.
- [202] Telfer J. F., Irvine G. A., Kohnen G., Campbell S., Cameron I. T., Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in non-pregnant and decidualized human endometrium., *Mol. Hum. Reprod.* 3 (1997) 69–75.
- [203] Mizuno K., Tanaka T., Umesaki N., Ogita S., Inhibition of cAMP-mediated decidualization in human endometrial stromal cells by IL-1beta and laminin., *Horm. Metab. Res. = Horm. Und Stoffwechselforsch. = Horm. Métabolisme.* 31 (1999) 307–10. doi:10.1055/s-2007-978742.
- [204] Wira C. R., Fahey J. V., Ghosh M., Patel M. V., Hickey D. K., Ochiel D. O., Sex Hormone Regulation of Innate Immunity in the Female Reproductive Tract: The Role of Epithelial Cells in Balancing Reproductive Potential with Protection against Sexually Transmitted Pathogens,

- Am. J. Reprod. Immunol. 63 (2010) 10.1111/j.1600-0897.2010.00842.x. doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00842.x.
- [205] Bachiocco V., Bergamaschi R., Spinsanti G., Lima M., Romagnoli R., Sorda G., Alois M., Lymphocyte TRPV 1-4 gene expression and MIF blood levels in a young girl clinically diagnosed with HSAN IV, Clin J Pain. 27 (2011) 631–634. doi:10.1097/AJP.0b013e3182119356.
- [206] Vivat V., Cohen-tannoudji J., Revellill P., Muzzinll P., Giacobinoll P., Maltier J. P., Legrand C., Regulates the & Adrenergic, (1992).
- [207] Kumar A., Kumari S., Majhi R. K., Swain N., Yadav M., Goswami C., Regulation of TRP channels by steroids: Implications in physiology and diseases, Gen. Comp. Endocrinol. 220 (2015) 23–32. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.10.004.
- [208] Idris A. I., Landao-Bassonga E., Ralston S. H., The TRPV1 ion channel antagonist capsazepine inhibits osteoclast and osteoblast differentiation in vitro and ovariectomy induced bone loss in vivo, Bone. 46 (2016) 1089–1099. doi:10.1016/j.bone.2010.01.368.
- [209] Rossi F., Bellini G., Torella M., Tortora C., Manzo I., Giordano C., Guida F., Luongo L., Papale F., Rosso F., Nobili B., Maione S., The genetic ablation or pharmacological inhibition of TRPV1 signalling is beneficial for the restoration of quiescent osteoclast activity in ovariectomized mice, Br. J. Pharmacol. 171 (2014) 2621–2630. doi:10.1111/bph.12542.
- [210] Wu Y. W., Bi Y. P., Kou X. X., Xu W., Ma L. Q., Wang K. W., Gan Y. H., Ma X. C., 17- β -Estradiol Enhanced Allodynia of Inflammatory Temporomandibular Joint through Upregulation of Hippocampal TRPV1 in Ovariectomized Rats, J. Neurosci. 30 (2010) 8710–8719. doi:10.1523/JNEUROSCI.6323-09.2010.
- [211] Kats R., Al-Akoum M., Guay S., Metz C., Akoum A., Cycle-dependent expression of macrophage migration inhibitory factor in the human endometrium., Hum. Reprod. 20 (2005) 3518–3525. doi:10.1093/humrep/dei234.
- [212] Hoenderop J. G. J., Nilius B., Bindels R. J. M., Calcium Absorption Across Epithelia, Physiol. Rev. 85 (2004) 373–422. http://physrev.physiology.org/content/85/1/373.abstract.
- [213] Cella M., Leguizamón G. F., Sordelli M. S., Cervini M., Guadagnoli T., Ribeiro M. L., Franchi A. M., Farina M. G., Dual Effect of Anandamide on Rat Placenta Nitric Oxide Synthesis, Placenta. 29 (2008) 699–707. doi:10.1016/j.placenta.2008.05.003.
- [214] E.S. Fernandes, M.A. Fernandes, J.E. Keeble, The functions of TRPA1 and TRPV1: moving

- away from sensory nerves, *Br. J. Pharmacol.* 166 (2012) 510–521. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01851.x.
- [215] J. Curry Thomas E., K.G. Osteen, The Matrix Metalloproteinase System: Changes, Regulation, and Impact throughout the Ovarian and Uterine Reproductive Cycle, *Endocr. Rev.* 24 (2003) 428–465. <http://dx.doi.org/10.1210/er.2002-0005>.
- [216] A.K. Goff, Steroid Hormone Modulation of Prostaglandin Secretion in the Ruminant Endometrium During the Estrous Cycle¹, *Biol. Reprod.* 71 (2004) 11–16. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.103.025890>.
- [217] Rocha M.G., Silva J. C., Ribeiro da Silva A., Candido Dos Reis F. J., Nogueira A. A., Poli-Neto O. B., TRPV1 expression on peritoneal endometriosis foci is associated with chronic pelvic pain., *Reprod Sci.* 18 (2011) 511–515. doi:10.1177/1933719110391279.
- [218] Poli-Neto O. B., Adnor Filho A., e Silva J. C. R., de Freitas Barbosa H., Dos Reis F. J. C., Nogueira A. A., Increased capsaicin receptor TRPV1 in the peritoneum of women with chronic pelvic pain, *Clin. J. Pain.* 25 (2009) 218–222.
- [219] Binshtok A. M., Wang H., Zimmermann K., Amaya F., Vardeh D., Shi L., Brenner G. J., Ji R. R., Bean B. P., Woolf C. J., Samad T. A., Nociceptors Are Interleukin-1 β Sensors, *J. Neurosci.* 28 (2008) 14062–14073. doi:10.1523/JNEUROSCI.3795-08.2008.
- [220] Mita S., Shimizu Y., Satoskar A. R., Notsu T., Imada K., Kyo S., Dienogest inhibits nerve growth factor expression induced by tumor necrosis factor- α ; or interleukin-1 α and β , *Fertil. Steril.* 101 (2014) 595–601.e1. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.10.038.
- [221] Malek N., Pajak A., Kolosowska N., Kucharczyk M., Starowicz K., The importance of TRPV1-sensitisation factors for the development of neuropathic pain, *Mol. Cell. Neurosci.* 65 (2015) 1–10. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2015.02.001.
- [222] Sales K. J., Jabbour H. N., Cyclooxygenase enzymes and prostaglandins in pathology of the endometrium, *Reproduction.* 126 (2003) 559–567.
- [223] Moriyama T., Higashi T., Togashi K., Iida T., Segi E., Sugimoto Y., Tominaga T., Narumiya S., Tominaga M., Sensitization of TRPV1 by EP(1) and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins, *Mol. Pain.* 1 (2005) 3. doi:10.1186/1744-8069-1-3.
- [224] Lowin T., Apitz M., Anders S., Straub R. H., Anti-inflammatory effects of N-acylethanolamines in rheumatoid arthritis synovial cells are mediated by TRPV1 and TRPA1 in a COX-2 dependent manner, *Arthritis Res. Ther.* 17 (2015) 321. doi:10.1186/s13075-015-

- [225] Coelho A., Wolf-Johnston A. S., Shinde S., Cruz C. D., Cruz F., Avelino A., Birder L. A., Urinary bladder inflammation induces changes in urothelial nerve growth factor and TRPV1 channels, *Br. J. Pharmacol.* 172 (2015) 1691–1699. doi:10.1111/bph.12958.
- [226] Arnold J., Vercellino G. F., Chiantera V., Schneider A., Mechsner S., Barcena de Arellano M. L., Neuroimmunomodulatory Alterations in Non-Lesional Peritoneum Close to Peritoneal Endometriosis, *Neuroimmunomodulation*. 20 (2013) 9–18.
<http://www.karger.com/DOI/10.1159/000342163>.
- [227] Laux-Biehlmann A., D’Hooghe T., Zollner T. M., Menstruation pulls the trigger for inflammation and pain in endometriosis, *Trends Pharmacol. Sci.* 36 (2016) 270–276. doi:10.1016/j.tips.2015.03.004.
- [228] Stratton P., Berkley K. J., Chronic pelvic pain and endometriosis: translational evidence of the relationship and implications, *Hum. Reprod. Update*. 17 (2011) 327–346. doi:10.1093/humupd/dmq050.
- [229] Birder L. A., Kanai A. J., de Groat W. C., Kiss S., Nealen M. L., Burke N. E., Dineley K. E., Watkins S., Reynolds I. J., Caterina M. J., Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 13396–13401. doi:10.1073/pnas.231243698.
- [230] Takumida M., Kubo N., Ohtani M., Suzuka Y., Anniko M., Transient receptor potential channels in the inner ear: presence of transient receptor potential channel subfamily 1 and 4 in the guinea pig inner ear, *Acta Otolaryngol.* 125 (2005) 929–934. doi:10.1080/00016480510038572.
- [231] S. Shimizu, N. Takahashi, Y. Mori, TRPs as Chemosensors (ROS, RNS, RCS, Gasotransmitters), in: B. Nilius, V. Flockerzi (Eds.), *Mamm. Transient Recept. Potential Cation Channels Vol. II*, Springer International Publishing, Cham, 2014: pp. 767–794. doi:10.1007/978-3-319-05161-1_3.
- [232] M. Zielińska, A. Jarmuż, A. Wasilewski, M. Sałaga, J. Fichna, Role of Transient Receptor Potential Channels in Intestinal Inflammation and Visceral Pain, *Inflamm. Bowel Dis.* 21 (2015) 419–427. doi:10.1097/MIB.0000000000000234.
- [233] B. Issa, T.S. Onon, A. Agrawal, C. Shekhar, J. Morris, S. Hamdy, P.J. Whorwell, Visceral hypersensitivity in endometriosis: a new target for treatment?, *Gut* . 61 (2012) 367–372. doi:10.1136/gutjnl-2011-300306.

- [234] Dmitrieva N., Johnson O. L., Berkley K. J., Bladder inflammation and hypogastric neurectomy influence uterine motility in the rat, *Neurosci. Lett.* 313 (2001) 49–52.
doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)02247-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940(01)02247-9).
- [235] Chaban V. V., Visceral sensory neurons that innervate both uterus and colon express nociceptive TRPV1 and P2X3 receptors in rats, *Ethn. Dis.* 18 (2008) 18646315.
- [236] K. Floyd, S.B. McMahon, J.F. Morrison, Inhibitory interactions between colonic and vesical afferents in the micturition reflex of the cat., *J. Physiol.* 322 (1982) 45–52.
- [237] T.C. Morrison, N. Dmitrieva, K.P. Winnard, K.J. Berkley, Opposing viscerovisceral effects of surgically induced endometriosis and a control abdominal surgery on the rat bladder, *Fertil. Steril.* 86 (2016) 1067–1073. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.03.026.
- [238] Brumovsky P. R., Gebhart G. F., Visceral organ cross-sensitization – an integrated perspective, *Auton. Neurosci.* 153 (2010) 106. doi:10.1016/j.autneu.2009.07.006.
- [239] Winnard K. P., Dmitrieva N., Berkley K. J., Cross-organ interactions between reproductive, gastrointestinal, and urinary tracts: modulation by estrous stage and involvement of the hypogastric nerve, *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291 (2006) R1592–R1601.
- [240] H.-Y. Peng, H.-M. Chang, S.-D. Lee, P.-C. Huang, G.-D. Chen, C.-H. Lai, C.-Y. Lai, C.-H. Chiu, K.-C. Tung, T.-B. Lin, TRPV1 mediates the uterine capsaicin-induced NMDA NR2B-dependent cross-organ reflex sensitization in anesthetized rats, *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 295 (2008) F1324–F1335.
- [241] H.-Y. Peng, G.-D. Chen, K.-C. Tung, C.-Y. Lai, M.-C. Hsien, C.-H. Chiu, H.-T. Lu, J.-M. Liao, S.-D. Lee, T.-B. Lin, Colon mustard oil instillation induced cross-organ reflex sensitization on the pelvic–urethra reflex activity in rats, *Pain.* 142 (2009) 75–88.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2008.11.017>.
- [242] Beharka A. A., Nagaraja T. G., Morrill J. L., Kennedy G. A., Klemm R. D., Effects of Form of the Diet on Anatomical, Microbial, and Fermentative Development of the Rumen of Neonatal Calves1, *J. Dairy Sci.* 81 (1998) 1946–1955. doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75768-6.
- [243] Blachier F., Yin Y., Wu G., Andriamihaja M., Terminal Digestion of Polypeptides and Amino Acid Absorption by the Pig Intestine Epithelial Cells During Development, in: F. Blachier, G. Wu, Y. Yin (Eds.), *Nutr. Physiol. Funct. Amin. Acids Pigs*, Springer Vienna, Vienna, 2013: pp. 51–57. doi:10.1007/978-3-7091-1328-8_4.
- [244] Buddington R. K., Malo C., Postnatal development of nutrient transport in the intestine of

- dogs, *Am. J. Vet. Res.* 64 (2003) 635–645. doi:10.2460/ajvr.2003.64.635.
- [245] Hanson L. A., Breastfeeding Provides Passive and Likely Long-Lasting Active Immunity, *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 81 (1998) 534–537. doi:10.1016/S1081-1206(10)62704-4.
- [246] Watson J. C., O.C. H., Khaledalid W. T., Cytokine signalling in mammary gland development, *J. Reprod. Immunol.* 88 (2011) 124–129. doi:10.1016/j.jri.2010.11.006.
- [247] A. Braun, M. Lommatzsch, A. Mannsfeldt, U. Neuhaus-Steinmetz, A. Fischer, N. Schnoy, G.R. Lewin, H. Renz, Cellular Sources of Enhanced Brain-Derived Neurotrophic Factor Production in a Mouse Model of Allergic Inflammation Notice to Professional Recruitment and Announcement Advertisers, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 21 (1999) 537–546. doi:10.1165/ajrcmb.21.4.3670.
- [248] M. Colitti, Expression of NGF, BDNF and their high-affinity receptors in ovine mammary glands during development and lactation, *Histochem. Cell Biol.* 144 (2015) 559–570. doi:10.1007/s00418-015-1360-0.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

Pohóczky Krisztina, Kun József, Szalontai Bálint, Szőke Éva, Sággy Éva, Payrits Maja, Kajtár Béla, Kovács Krisztina, Környei József László, Garai János, Garami András, Perkecz Anikó, Czeglédi Levente, Helyes Zsuzsanna (2016). Estrogen-dependent up-regulation of TRPA1 and TRPV1 receptor protein in the rat endometrium. JOURNAL OF MOLECULAR ENDOCRINOLOGY, vol. 56 no. 2, pp.135-49. doi:10.1530/JME-15-0184

IF: 2,947 Q1

Bohonyi Noémi, Pohóczky Krisztina, Szalontai Bálint, Perkecz Anikó, Kovács Krisztina, Kajtár Béla, Orbán Lajos, Varga Tamás, Szegedi Sarolta, Bódis József, Helyes Zsuzsanna, Koppán Miklós (2017) Local upregulation of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) and Vanilloid 1 (TRPV1) ion channels in rectosigmoid deep infiltrating endometriosis. MOLECULAR PAIN, *megosztott első szerzős eredeti közlemény* (E közlemény molekuláris biológiai és analitikai része jelen dolgozat témájául szolgáló saját eredményem, Bohonyi Noémi majdani PhD dolgozatában szereplő klinikai eredményeket egyértelműen elhatároltam).

IF: 3,533 Q1

Pohóczky Krisztina, Tamás Andrea, Reglődi Dóra, Bagoly Teréz, Helyes Zsuzsanna, Czeglédi Levente (2017) Examination of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide (PACAP) in the sheep udder and milk, and in the lamb plasma after suckling. LIVESTOCK SCIENCE. *Pozitív bírálat megtörtént (major revision), jelenleg a bírálók által feltett kérdések megválaszolása történik.*

IF: 1,293 Q1

Összesített impact faktor: 6,48 (az első kettő publikáció alapján)

EGYÉB EREDETI PUBLIKÁCIÓK

Sághy Éva, Sipos Éva, Ács Péter, Bölcskei Kata, Pohóczky Krisztina, Kemény Ágnes, Sándor Zoltán, Szőke Éva, Sétáló György, Komoly Sámuel, Pintér Erika (2016) TRPA1 deficiency is protective in cuprizone-induced demyelination-A new target against oligodendrocyte apoptosis. GLIA 64:(12) p: 2166-2180. DOI: 10.1002/glia.23051
IF: 5,997

Kun József, Szitter István, Kemény Ágnes, Perkecz Anikó, Kereskai László, Pohóczky Krisztina, Vincze Áron, Godi S, Szabo István, Szolcsányi János, Pintér Erika, Helyes Zsuzsanna (2014) Upregulation of the transient receptor potential ankyrin 1 ion channel in the inflamed human and mouse colon and its protective roles. PLOS ONE 9:(9) Paper e108164. 15
IF: 3.534

de Oliveira Cristiane, Garami Anadrás, Lehto Sonya G, Pakai Eszter, Tékus Valéria, Pohóczky Krisztina, Youngblood Beth D, Wang Weiya, Kort Michael E, Kym Philip R, Pintér Erika, Gavva Narendra R, Romanovsky Andrej A (2014) Transient receptor potential channel ankyrin-1 is not a cold sensor for autonomic thermoregulation in rodents. JOURNAL OF NEUROSCIENCE 34:(13) pp. 4445-4452. (2014)
IF: 6.908

Gulyás Gabriella, Béri Béla, Jávör András, Márk László, Csősz Éva, Pohóczky Krisztina, Soltész Beáta, Kuti Dániel, Czeglédi Levente (2012) Holtein-Fríz tehének hosszú hasznos élettartamának vizsgálata proteomikai módszerekkel. Debreceni Egyetem Agrártudományi Közlemények, Acta Agraria Debreceniensis.

Könyvrészlet:

Czeglédi Levente, Pohóczky Krisztina, Gulyás Gabriella, Soltész Beáta, Jávör András (2012) Proteome analysis of musculus longissimus dorsi of Hungarian Merino and Tsigai sheep breeds. In: P.: Rodrigues, Eckersall D. and Almeida A. (eds.), Farm Animal Proteomics. 1-208, Wageningen Academic Press, (ISBN: 978-90-8686-195-8). 123-126.

IDÉZHETŐ ABSZTRAKTOK

Pohóczky Krisztina, Kun József, Szalontai Bálint, Kovács Krisztina, Garai János, Garami András, Perkecz Anikó, Helyes Zsuzsanna (2014) Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) and vanilloid 1 (TRPV1) ion channels are expressed and upregulated in response to estrogen in the rat endometrium. JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE 53:(Suppl. 1.) p. S179. 20th International Symposium on Regulatory Peptides (REGPEP2014). Konferencia helye, ideje: Kyoto, Japán: 2014.09.07 -2014.09.10. **IF: 2,757**

Pohóczky Krisztina, Kun József, Garai János, Garami András, Perkecz Anikó, Helyes Zsuzsanna (2013) A TRPV1 receptor jelenléte és ösztrogén kezelés hatására történő expresszió-növekedése patkány endometriumbanIn: - (szerk.) XIV. Conference of the Hungarian Neuroscience Society abstract book. 282 p. (ISBN:978-963-88224-2-0). Konferencia helye, ideje: Budapest, Magyarország: 2013.01.17-2013.01.19.

József Kun, Zsuzsanna Helyes, István Szitter, Szilvia Gódi, Ivett Szabó, Ágnes Kemény, Krisztina Pohóczky, Anikó Perkecz, Erika Pintér (2013) Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) and Vanilloid 1 (TRPV1) receptor mRNA expression in inflammatory bowel disease (IBD) and dextran sulfate-induced colitis in mice. JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE 51:(Suppl. 159. **IF: 2,757**

József Kun, Krisztina Pohóczky, János Garai, András Garami, Anikó Perkecz, Zsuzsanna Helyes (2013) The presence and estrogen-mediated upregulation of the TRPV1 receptor in rat endometrium In: Hohol R, Heiszler Zs (szerk.) Hungarian Molecular Life Sciences programme & book of abstracts. 287 p. Budapest: Diamond Congress Ltd. (ISBN:978-615-5270-02-4). Konferencia helye, ideje: Siófok, Magyarország: 2013.04.05- 2013.04.07.

Krisztina Pohóczky, József Kun, János Garai, András Garami, Anikó Perkecz, Zsuzsanna Helyes (2013) Expression and hormone-mediated upregulation of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) and Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in the rat endometrium. PERIODICUM BIOLOGORUM 115:(2) p. 46. 3. Congress of Croatian Physiological Society and 1. Regional Congress of the Physiological Societies. Konferencia helye, ideje: Rijeka, Horvátország: 2013.09.13 -2013.09.15. **IF: 0,2**

József Kun, Zsuzsanna Helyes, István Szitter, Ágnes Kemény, Dávid Ernszt, Tamás Kovács, András Bognár, Krisztina Pohóczky, Éva Szőke, Éva Sággy, Teréz Bagoly, Adrienn Markovics, Anikó Perkecz, Erika Pintér (2013) Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (Trpa1) receptor knockout mice are more susceptible to dextrane-sulfate induced colitis. PERIODICUM BIOLOGORUM 115:(2) p. 38. 3. Congress of Croatian Physiological Society and 1. Regional Congress of the Physiological Societies.

Konferencia helye, ideje: Rijeka, Horvátország: 2013.09.13 -2013.09.15. **IF: 0,2**

József Kun, Zsuzsanna Helyes, István Szitter, Ágnes Kemény, Dávid Ernszt, Éva Szőke, Éva Sággy, Tamás Kovács, András Bognár, Krisztina Pohóczky, Teréz Bagoly, Adrienn Markovics, Anikó Perkecz, Zoltán Sándor, Erika Pintér (2013) Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) receptor has a protective role in dextrane-dulfate induced mouse colitis. IMMUNOLÓGIAI SZEMLE 5:(3) p. 32.

József Kun, Zsuzsanna Helyes, István Szitter, Ágnes Kemény, Dávid Ernszt, Éva Szőke, Éva Sággy, Tamás Kovács, András Bognár, Krisztina Pohóczky, Teréz Bagoly, Adrienn Markovics, Anikó Perkecz, Zoltán Sándor, Erika Pintér (2013) Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) receptor has a protective role in dextrane-sulfate induced mouse colitis. Immunológiai szemle 5:(3) p. 32.

Czeglédi Levente, Gulyás Gabriella, Prokisch József, Birkó Zsuzsanna, Keserű Judit, Pohóczky Krisztina, Jávör András (2011) Selenium as feed supplement changes proteome of chicken liver. In: COST Farm Animal Proteomics Spring Meeting: Selected presentations WG2. p. 39. Konferencia helye, ideje: Glasgow, Egyesült Királyság / Skócia

Az összes publikáció (teljes közlemények és kivonatok) kumulatív impakt faktora

IF (citalható absztraktok nélkül): 22,919

Összes idézők száma MTMT: 26

Összes idézők száma Google Scholar: 56

Ebből független MTMT: 22

H-index: 3

KONGRESSZUSI SZÓBELI ELŐADÁSOK JEGYZÉKE

47. Membrán-transzport Konferencia Sümeg, 2017. május 16-19. A Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1 és Vanilloid 1 ioncsatornák jelenléte, valamint ösztrogénkezelés hatására és endometriózisban történő expresszió-változásai kísérletes állatmodellekben és klinikai mintákban. Kovács Tibor díj átadásával egybekapcsolt előadás

PTE Idegtudományi Centrum és Szentágotthai János Kutatóközpont PhD és TDK konferencia Pécs, 2014. november 13-14.

A Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1 és Ankyrin 1 ioncsatornák jelenléte és ösztrogén kezelés hatására történő expresszió-növekedése patkány endometriumban.

PhD/5 szekció: 1. helyezés

II. Neuroendokrinológiai Szimpózium Pécs, 2015. június 5.

A TRPA1 és TRPV1 receptor jelenléte, valamint ösztrogén kezelés hatására történő expresszió-növekedése patkány endometriumban.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőimnek, Helyes Zsuzsanna Professzorasszonynak és Dr. Czeglédi Leventének szakmai irányításukat, valamint a rengeteg segítséget, amelyet PhD tanulmányaim során nyújtottak. Lelkesedésük, pozitív gondolkodásuk valamint a szakma iránti elkötelezettségük követendő példaként szolgált számomra.

Szeretnék köszönetet mondani Pintér Erika Professzorasszonynak, a Gyógyszertudományok Doktori Iskola vezetőjének, tanácsaiért és a kutatómunkám során nyújtott segítségéért. Köszönet illeti Szolcsányi János Professzort, doktori iskolánk megalapítóját, aki szakmai elhivatottságával, segítőkészségével példát mutat mindannyiunk számára.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Szőke Évának, Dr. Bölcskei Katának és Dr. Poór Miklósnak, akik szakmai tanácsaikkal segítették munkámat. Köszönöm Dr. Bohonyi Noéminek, Dr. Szalontai Bálintnak, Dr. Kun Józsefnek, Dr. Kajtár Bélának, Dr. Kovács Krisztinának, Dr. Környei Józsefnek, Dr. Garami Andrásnak és Dr. Garai Jánosnak, hogy segítséget nyújtottak a kéziratok megírása során.

Köszönöm PhD hallgató társaimnak, Dr. Sággy Évának, Dr. Csekő Katának, Payrits Majának, Bencze Noéminek és Dr. Aczél Tímeának, hogy mindennapjaimat egy vidám, pozitív környezetben tölthetem, és hogy számíthatok rájuk mind szakmai, mind pedig magánéleti kérdésekben.

Köszönöm a kísérletek során nyújtott nélkülözhetetlen segítségét Disztl Cecíliának, Buzási Ádámné Annának, Perkecz Anikónak, Bagoly Teréznek és Ömböli Gyuláné Dórának. Köszönettel tartozom kollaborátorainknak, a PTE ÁOK Patológiai Intézetének, a PTE KK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájának, a PTE ÁOK Transzlációs Medicina Intézetének és a DE AGTC Állattenyésztési és Takarmányozási Intézetének. Továbbá köszönöm a PTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet minden tagjának, hogy én is részese lehetek egy ilyen nagyszerű, vidám csapatnak.

Végül, de nem utolsósorban hálás köszönettel tartozom szüleimnek, nagypapámnak és testvéreimnek, akik mindig támogattak és biztattak. Köszönöm továbbá férjemnek, Hartner Gergelynek a sok türelmet és támogatást, amely nélkül e dolgozat nem jöhetett volna létre.

A kutatás az Európai Unió és Magyarország támogatásával a GINOP-2.2.1-15-2016-00020 azonosító számú „Új, több támadáspontú innovatív fájdalomcsillapító fejlesztése: hatástani, preklinikai és humán fázis I. vizsgálatok” és a GINOP-2.3.3.-15-2016-00050 azonosító számú „PEPSYS-A peptiderg szignalizáció komplexitása és szerepe szisztémás betegségekből” című projektek keretei között valósult meg.

NYILATKOZAT

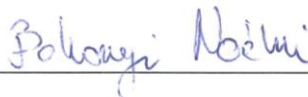
Alulírott **Pohóczky Krisztina** (szül. hely, idő: Ózd, 1989. 06. 03., anyja neve: Pozbai Mária Lenke, sz.ig. szám: 152010PA) és **Dr. Bohonyi Noémi** (szül. hely, idő: Marosvásárhely (Târgu Mureș), Románia, 1987. 03. 28., anyja neve: Keresztesi Imola, sz.ig. szám: 881636PA) a PTE ÁOK Gyógyszertudományok Doktori iskola (D92, vezető: Prof. Dr. Pintér Erika) és a PTE ÁOK Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola (D94, vezető: Dr. Kovács L. Gábor) PhD hallgatói **kijelentjük**, hogy a Molecular Pain folyóiratban 2017-ben megjelent „Local upregulation of transient receptor potential ankyrin 1 and transient receptor potential vanilloid 1 ion channels in rectosigmoid deep infiltrating endometriosis” (doi: 10.1177/1744806917705564) című publikációmban megosztott első szerzők vagyunk.

Továbbá kijelentjük, hogy e közlemény molekuláris biológiai és analitikai része Pohóczky Krisztina, a klinikai eredményeket felvonultató része pedig Dr. Bohonyi Noémi PhD értekezésének részét képezi. Azon részeket, amelyek a másik fél munkájában származnak, azonban az értekezések értelmezhetősége szempontjából nélkülözhetetlenek, az értekezésekben egyértelműen elhatároljuk az adott módszerek és eredmények leírásánál.

Kelt: Pécs, 2017. 06. 19.



Pohóczky Krisztina



Dr. Bohonyi Noémi

Előttünk, mint tanúk előtt:

Név: Disztli Cecília

Cím: 8940 Széplővenc, Pécsi út 16/A

Sz.ig. szám: 666561PA



aláírás

Név: CSEKŐ KATA

Cím: 8229 CSOPAK BENCZE L. U. 6/A

Sz.ig. szám: 599174RA



aláírás