Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1 és Ankirin 1 receptorok aktivációs és gátló mechanizmusainak *in vitro* és *in vivo* vizsgálata

Doktori (PhD) értekezés



Payrits Maja Enikő

Gyógyszertudományok Doktori Iskola Neurofarmakológia Program

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

Témavezető: Dr. Szőke Éva

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Pécs, 2018.

I. Tartalomjegyzék

I.	Tartalomjegyzék1
II.	Rövidítések jegyzéke4
III.	Kutatási koncepció6
IV.	Bevezetés, irodalmi háttér7
	IV.1. A fájdalom és fájdalomcsillapítás kutatása7
	IV.1.1. A kapszaicin és receptorának története7
	IV.2. A TRPV1 és a TRPA1 receptorokat expresszáló kapszaicin-érzékeny érzőideg-
	végződések hármas funkciója és szerepe a fájdalomban és neurogén gyulladás8
	IV.3. A Tranziens Receptor Potenciál (TRP) receptorok10
	IV.3.1. TRPV1 és TRPA1 receptorok felépítése és funkciója12
	IV.4. Gyógyszerfejlesztési lehetőségek18
	IV.5. A szemikarbazid-szenzitív amin-oxidáz szerepe a gyulladásban és a
	fájdalomban20
	IV.5.1. Egy új ígéretes SSAO inhibítor vegyület, az SZV-128722
	IV.6. Az ösztradiol szerepe a fájdalomban23
V.	Célkitűzések25
VI.	Kísérleti modellek és vizsgálati módszerek26
	VI.1. Kísérleti modellek
	VI.1.1. Kísérleti állatok és kezelésük26
	VI.1.2. Primer szenzoros neuron kultúra hátsógyöki ganglionból (DRG) és
	trigeminális ganglion (TRG) sejtből26
	VI.1.3. TRPV1 és TRPA1 receptor-expresszáló sejtvonalak
	VI.2. Vizsgálati módszerek28
	VI.2.1. Intracelluláris Ca ²⁺ koncentráció mérés mikrofluorimetriával28
	VI.2.2. Radioaktív ⁴⁵ Ca ²⁺ felvétel vizsgálatok29
	VI.2.3. CGRP felszabadulás mérése radioimmunoassay (RIA) módszerrel30
	VI.2.4. mRNS espresszió vizsgálat valós-idejű kvantitatív polimeráz láncreakcióval
	(qPCR)
	VI.2.5. Mechanonociceptív küszöbérték mérése eszteziométerrel32
	VI.2.6. Termonocicptív küszöbérték mérése emelkedő hőmérsékletű forró lappal.33
	VI.2.7. Kenetminta meghatározása34
	VI.2.8. TRPV1 agonista RTX indukálta gyulladásos hiperalgézia vizsgálata34

	VI.3. Statisztikai analízis
VII.	Eredmények
	VII.1. SZV-1287 TRPA1 és TRPV1 ioncsatornák aktivációjára kiváltott hatásának
	vizsgálatái eredményei36
	VII.1.1. Az SZV-1287 gátolja a TRPA1 receptor által közvetített Ca ²⁺ -beáramlást
	TRG sejttenyészet neuronjaiba36
	VII.1.2. Az SZV-1287 gátolja a TRPV1 receptor által közvetített Ca ²⁺ -beáramlást TRG sejttenyészet neuronjaiba
	VII.1.3. Az SZV-1287 csökkenti a TRPA1-indukálta CGRP-felszabadulást
	perifériás érzőideg végződésekből43
	VII.1.4. Az SZV-1287 gátolja az AITC- és a kapszaicin által indukált Ca ²⁺ -
	beáramlást és ⁴⁵ Ca ²⁺ izotóp felvételt TRPA1 és TRPV1 expresszáló CHO
	sejtekbe45
	VII.1.5. Eredmények összefoglalása47
	VII.2. Az E2 TRPV1 ioncsatorna aktivációra kiváltott hatásának vizsgálati
	eredményei49
	VII.2.1. Nemi hormon függő különbségek az egerek mechano- és termonociceptív
	küszöbértékében49
	VII.2.2. Nemi hormon függő különbségek nem figyelhetők meg a nocicepcióban
	TRPV1 génhiányos egereknél51
	VII.2.3. TRPV1 aktiváció-indukálta mechanikai hiperalgézia fokozódás E2
	hatására
	VII.2.4. ERa, ERβ, GPER1 és TRPV1 mRNS expresszió primer szenzoros
	neuronokon53
	VII.2.5. Az E2 fokozza a kapszaicin által kiváltott TRPV1 aktivációt primer
	szenzoros neuron tenyészetben54
	VII.2.6. Eredmények összefoglalása
VIII.	Megbeszélés, következtetések
	VIII.1. Az SZV-1287 TRPV1 és TRPA1 antagonista hatása
	VIII.2. Az ösztradiol fájdalomban betöltött szerepe
	VIII.2.1. Az E2 lehetséges hatásmechanizmusa fájdalomban63
	VIII.2.2. Klinikai jelentőség66
IX.	Új eredmények összefoglalás
X.	Irodalmi hivatkozások

XI.	Az értékelés alapját képező publikációk	.88
XII.	Egyéb eredeti publikációk	.89
XIII.	Idézhető absztraktok	90
XIV.	Kongresszusi poszter prezentációk	.91
XV.	Köszönetnyilvánítás	.97

II. Rövidítés jegyzék

AITC:	allil-izotiocianát	
ANK:	ankirin domén	
ANOVA:	analysis of variance/variancia-analízis	
ATP:	adenozin trifoszfát	
CaM:	kalcium-kalmodulin	
CAPS:	kapszaicin	
cDNS:	komplementer DNS	
CGRP:	calcitonin gene-related peptide/kalcitonin gén-rokon peptid	
CHO:	chinese hamster ovary/kínai hörcsög ovárium	
COX:	ciklooxigenáz	
CZP:	kapszazepin	
D-MEM:	Dulbecco's-Modified Eagle Medium	
DMSO:	dimetil-szulfoxid	
DRG:	dorsal root ganglion/hátsógyöki ganglion	
E2:	17β-ösztradiol	
ECS:	extracellularis oldat	
ER:	ösztrogén receptorok	
ERa:	ösztrogén receptor α	
ΕRβ:	ösztrogén receptor β	
fura-2 AM:	fura-2 acetoxi-metilészter	
GPER1:	G protein-kapcsolt ösztrogén receptor	
H ₂ O ₂ :	hidrogén-peroxid	
LPA:	lizofoszfatidsav	
LPO:	lipid peroxidáció	
NGF:	idegi növekedési faktor	
NK:	neurokinin	

OVX:	ovariektomizált
PBS:	foszfát puffer oldat
PIP2:	foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát
PK:	protun kináz
ΡΚCε:	protein kináz Cε
qPCR:	quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction/kvantitatív valós- idejű polimeráz láncreakció
RIA:	radioimmunoassay
RTX:	reziniferatoxin
SST:	szomatosztatin
SP:	Substane P / P-anyag
TM:	transzmembrán domén
TMJ:	temporomandibuláris ízület
ΤΝΓα:	tumor nekrózis fakrtor α
TrkA:	tropomiozin receptor kináz A
TRP:	Tranziens Receptor Potenciál
TRPA1:	Tranziens Receptor Potenciál Ankirin 1 receptor
TRPA1 ^{+/+} :	Tranziens Receptor Potenciál Ankirin 1 vad típusú
TRPA1-/-:	Tranziens Receptor Potenciál Ankirin 1 génhiányos
TRPV1:	Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1
TRPV1-/-:	Transient Receptor Potential Vanilloid 1 génhiányos
WT:	wild-type / vad típus

III. Kutatási koncepció

Napjainkban széles körben kutatják a krónikus gyulladásos és fájdalomállapotok kezelésében potenciálisan használható hatóanyagcsoportokat, mivel neuropátiás fájdalomra jelenleg nem állnak rendelkezésünkre olyan gyógyszerek, melyek jelentősebb mellékhatások nélkül, tartósan alkalmazhatók. Az analgetikumok fejlesztési stratégiájának fontos eleme a fájdalomérző idegvégződéseken található szenzoros receptorok vizsgálata. A nociceptorok aktivációját szelektíven gátló anyagok kedvezőbb mellékhatásprofillal rendelkezhetnek, és hatékonyabbak lehetnek a neuropátiás fájdalom kezelésére is, mint a jelenleg neuropátiában használt szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerek.

A Tranziens Receptor Potenciál (TRP) ioncsatornák szerepet játszanak a fájdalom és a neurogén gyulladás kialakításának mechanizmusában, az érzőidegek aktivációján keresztül. Kutatócsoportunk a TRP ioncsatornák aktivációját vizsgálja trigeminális és hátsógyöki érzőideg-sejteken, valamint perifériás szenzoros neuronok idegvégződésein. Ezek a receptorok célpontjai lehetnek új hatásmechanizmusú gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító gyógyszerek fejlesztésének. Ezért fontos tehát ezen receptorok, elsősorban a Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1 (TRPV1) és Tranziens Receptor Potenciál Ankirin 1 (TRPA1) gyulladásban betöltött szerepének ioncsatornák fájdalomban és és működési mechanizmusuknak minél pontosabb megismerése.

IV. Bevezetés, Irodalmi háttér

IV.1. A fájdalom és fájdalomcsillapítás kutatása

A fájdalom (aktuális vagy potenciális) szöveti károsodás hatására létrejövő szubjektív érzet, melyet a nociceptorok érzékelnek és a szenzoros stimulust a test különböző pontjairól a központi idegrendszerbe juttatják. A fájdalom érzékelése hasznos, figyelmeztető funkcióval bír a jelentkező külső veszélyre, vagy a szervezetben lezajló kóros folyamatra, betegségre. Csillapításának vágya viszont az emberiséggel egyidős, már az ókorban is használták az ópium tartalmú mákgubó nedvét altatásra és a fájdalom csillapítására, és az opioid vegyületek jelenleg is széles körben használt analgetikumok.

Napjainkban opioidokat, nem-szteroid gyulladáscsökkentőket (NSAID) és adjuváns analgetikumokat használunk a fájdalom kezelésére. Megkülönböztetünk gyulladásos, szomatikus (bőr, izom, csont), viszcerális (belső szervek) és neuropátiás eredetű fájdalmat. A neuropátiás fájdalom a perifériás vagy központi idegi apparátus károsodása vagy megbetegedése révén jön létre. Az NSAID gyulladáscsökkentők és fájdalomcsillapítók a ciklooxigenáz (COX) enzim gátlásával csökkentik a prosztaglandin szintézist, és a gyulladáskeltő neuropeptidek kialakulásának gátlásával a fájdalom létrejöttét. Ezek a gyógyszerek azonban nem alkalmasak a gyulladás neurogén komponenseinek csökkentésére és a neuropátiás fájdalom teljeskörű csillapítására. Az opioid gyulladáscsökkentők nagy dózisban csökkentik a neuropátiás fájdalmat, viszont súlyos mellékhatásaik ugyan (pl. gasztrointesztinális vérzések), valamint a velük szemben kialakuló tolerancia miatt nem alkalmazhatók hosszú távon. Az opioid származékok hatásosak például tumoros fájdalom csillapításakor, azonban nem megfelelő a hatásuk neuropátiában. Jelenleg tehát a neuropátiás fájdalom terápiája nem megoldott, így nagy igény lenne új hatásmechanizmusú gyógyszerek kifejlesztésére. Új irányt jelentett a fájdalomcsillapítás kutatásában a kapszaicin érzékeny érzőideg végződések jellemzése és a kapszaicin receptorának azonosítása (Gyires és Fürst, 2011; Vizi, 2002).

IV.1.1. A kapszaicin és receptorának története

John Clough Thresh 1846-ben a paprikából izolálta és a *Capsicum* nemzetség után nevezte el a csípősségért felelős vegyületet, a kapszaicint (8-metil-N-vanillil-6-nonénamid), továbbá feltételezte, hogy a vanillinhez hasonló szerkezetű vegyület (Thresh, 1846). Harminc év múltán Hőgyes Endre kísérletsorozatával bizonyította, hogy a kapszaicin elsődlegesen az érző idegekre

fejt ki hatást (Hőgyes, 1878). Struktúráját az 1920-as évek elején azonosították (Nelson, 1919), rá tíz évvel sikerült véghezvinni a szintézisét (Spath és Darling, 1930). A kapszaicin első farmakológiai vizsgálatait magyar kutatók végezték. Jancsó Miklós írta le, hogy a kapszaicin nagy dózisainak alkalmazás után deszenzitizáció alakul ki kémiai fájdalomkeltő anyagokkal szemben (Jancsó, 1960). Később megfigyelték, hogy a kapszaicin-érzékeny nociceptorok stimulációja vazodilatációt és plazma extravazációt vált ki, amit a kapszaicinnel történő deszenzibilizáció és denerváció is gátol. Továbbá feltételezték, hogy a gyulladás kialakulásáért felelős mediátorok a kapszaicin-érzékeny érzőideg végződéskből szabadulnak fel (Jancsó és mtsai., 1967, 1968). Bizonyították, hogy a hosszan tartó kapszaicin kezelés károsítja a trigeminális és hátsógyöki primer szenzoros neuronokat (Joó és mtsai., 1969; Szolcsányi és mtsai., 1975). Kiemelten fontos Szolcsányi János és Jancsó-Gábor Aranka publikációja, melyben több vanilloid szerkezetű vegyület fájdalomkeltő hatásait vizsgálva, szerkezet-hatás összefüggések megfigyelése alapján bizonytották, hogy a kapszaicin egy speciális receptoron keresztül szelektíven fejti ki hatását (Szolcsányi és Jancsó-Gábor, 1975; 1976). 1990-ben leírták, hogy a reziniferatoxin (RTX) a kapszaicinnel azonos kation csatornákat aktiválja hátsógyöki érző neuronokon (Bevan és Szolcsányi, 1990), továbbá specifikus RTXkötőhelyeket mutattak ki (Szállási és Blumberg, 1990). Nagy jelentőséggel bírt a fájdalomkutatásban a kapszaicin receptort expresszáló gén azonosítása és receptorának klónozása (Caterina és mtsai., 1997), melyet több vanilloid szerkezeti elemet tartalmazó vegyülettel való aktiválhatósága miatt Vanilloid 1 Receptornak neveztek el. Később molekuláris szerkezete alapján a TRP szupercsaládba sorolták a receptort, azon belül pedig a Vanilloid alcsalád első tagja lett a TRPV1 receptor (Gunthorpe és mtsai., 2002).

IV.2. A TRPV1 és a TRPA1 receptorokat expresszáló kapszaicin-érzékeny érzőidegvégződések hármas funkciója és szerepe a fájdalomban és neurogén gyulladásban

A kapszaicin specifikus receptorát, a TRPV1 receptort expresszáló érző neuronok a vékony mielinhüvelyes (Aδ-) és a mielinhüvely nélküli (C-) rostokkal rendelkező neuronok kb. 60 %át képezik (Holzer, 1991). A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződések három fő funkciót látnak el, a klasszikus afferens funkciójuk mellett lokális- és szisztémás efferens funkciókkal is rendelkeznek. A klasszikus afferens működés során az idegvégződés inger (pl.: kapszaicin, pH változás, hő) hatására ingerületet továbbít a központi idegrendszerbe, ahol kialakul a nocicepció. Ezzel párhuzamosan az aktivált perifériás idegvégződésekből neurotranszmitterek - kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP) és tachykininek (pl. P-anyag, neurokinin A) - szabadulnak fel, melynek következtében vazodilatáció jön létre és a gyulladásos sejtek (leukocita, makrofág, hízósejt) felhalmozódását követően plazmaprotein exravazáció lép fel, és neurogén gyulladás alakul ki. Ezt együttesen nevezzük az idegvégződés lokális efferens működésének (Jancsó és mtsai., 1967; Helyes és mtsai., 2003). Harmadik funkciója a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződéseknek, mikor a belőlük felszabaduló szomatosztatin a keringésbe jutva szisztémás gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatást fejt ki, ez a szisztémás efferens funkció és ez indokolja ezen érzőideg-végződésekkel kapcsolatban az ún. szenzokrin jelző használatát (Szolcsányi, 1996) (1. ábra).

Ezeken az idegvégződéseken expresszálódnak elsődlegesen a fájdalom és neurogén gyulladás kialakulásában kulcsszerepet játszó TRPV1 és TRPA1 ioncsatornák. A TRPV1 és TRPA1 receptorok koexpressziója jelentős, a TRPV1-et expresszáló neuronok 30-50%-a tartalmaz TRPA1 receptort, TRPA1 ritkán fordul elő neuronokon TRPV1 receptor nélkül (Story és mtsai., 2003; Kobayashi és mtsai., 2005). A TRPA1 és TRPV1 funkcionális dimerként való működésére számos kutatócsoport hívta fel a figyelmet. Leírták együttes szerepüket gyulladás és fájdalom kialakulásában. Bizonyították, hogy a TRPA1 receptoron keresztüli deszenzitizációt szenzoros neuronokban a TRPV1-irányított internalizáció szabályozza (Akopian és mtsai., 2007), valamint hogy a TRPV1 receptor regulálja a TRPA1 aktivációját és modulációját a Ca²⁺-áramok szabályozásával (Patil és mtsai., 2010). Továbbá a TRPA1 mediálta neuronális válaszok sokszor a TRPA1 és TRPV1 receptor koexpressziója miatt jelennek meg, a TRPA1 receptort önmagában expresszáló sejtvonalon nem (Salas és mtsai., 2009).



1. ábra: Kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződések hármas funkciója. CGRP: kalcitonin gén-rokon peptid, SP: P-anyag, NK: neurokinin A, SST: szomatosztatin

IV.3. A Tranziens Receptor Potenciál (TRP) receptorok

A TRP receptorok polimodális, membránban jelenlévő, Ca²⁺ és Mg²⁺ preferenciájú nemszelektív kation csatornák. Fontos szerepet töltenek be a sejtek ion homeosztázisában, a membránon keresztüli iontranszport és az intracelluláris organellumok funkciójának szabályozása révén. Így a TRP csatornafunkció jelentős hatással lehet számos celluláris és szisztémás folyamatra (Nilius, 2007). Különböző kémiai (endogén és exogén lingandok) és fizikai (hőmérséklet, feszültség, kémhatás, nyomás) hatásokat követően Ca²⁺-beáramlás következtében aktiválódnak a receptorok, melyet depolarizáció követ (Nilius és Szállási, 2014). A TRP receptorok számos neuronális és nem neuronális szövetben és sejttípusban is kifejeződnek (Pedersen és mtsai., 2005). A TRP receptorokat szerkezeti homológiájuk és szekvencia különbségeik alapján alcsaládokba soroljuk: TRPV (Vanilloid), TRPA (Ankirin), TRPC (Kanonikus/Klasszikus), TRPM (Melasztatin), TRPML (Mukolipin), TRPP (Policisztin), TRPN (NOMPC-szerű). Emlősökben 28 tagját azonosították (Clapham és mtsai., 2001). TRPN1 csak az alsóbbrendű gerincesekben, például a zebrahalban van jelen, míg TRPC2 emberben egy pszeudogén (2. ábra). Számos hasonlóság figyelhető meg az alcsaládok között, valamennyi hat transzmembrán alegységből épül fel (S1–S6), a két utolsó domén között alakult ki a pórusformáló hurok. N- és C-terminálisaik intracellulárisan helyezkednek el, mely végződések előtt változatos szekvenciájú és hosszúságú aminosav láncok jöttek létre. Ezek az intracelluláris régiók szabályozzák elsősorban a csatorna működését (Gaudet, 2008).

Számos TRP ioncsatorna vesz részt a sejtproliferáció és növekedés szabályozásában, melynek diszfunkciója megváltozott organogenezishez és növekedési zavarokhoz, vagy akár daganat kialakulásához is vezethetnek. Képesek ingerelhető sejtek elektromos aktivitásának modulálására, például az agyban és a szívben (Nilius, 2007). A szervezetben való széleskörű jelenlétünk, és számos funkciójuk révén a TRP ioncsatornák szerepe számos betegségben bizonyítást nyert. Párat kiemelve: légúti betegségek (TRP-V1, V4, A1, C1, C3, C4, C5, C6), szívbetegségek (TRP-C1, C3, C5, C6, V2, P2), immunválasz sérülése (TRP-C1, M3, M4), daganatos betegségek bizonyos típusai (TRP-M1, M5, V5, M8; mellrák – TRP-C4, V1, V3; M5, M8; prosztatadaganat – V2, V6, M8; tüdőrák- C6, M5, M8), hiperalgézia (TRP-V1, V4, M8), gasztrointesztinális betegségek (TRP-V1, A1, V5), diabétesz (TRP-V1, V3, M4, M5), hipertenzió (TRP-C1, C2, C6, V4, M7), bőrbetegségek (TRP-A1, V1, C4), vesebetegségek (TRP-V5, V6, P2, P3, P5), neurodegeneratív betegségek (TRP-A1, V1, C1, C5, C6, M2, M3, M6, M7, P3) (Nilius és mtsai., 2005; Nilius, 2007; Kaneko és Szallasi, 2014). Mindez felhívja a figyelmet a TRP ioncsatornák fontosságára, és pontos tanulmányozásának szükségességére. Tézisem középpontjában a TRPV1 és TRPA1 receptorok aktivációs és gátló mechanizmusainak vizsgálata áll.



2. ábra: A TRP csatornák szekvencia homilógia alapján létrehozott filogenetikai fája (Nilius és Owsianik, 2011).

IV.3.1. TRPV1 és TRPA1 receptorok felépítése és funkciója

A TRPV1 receptor tehát a TRP szupercsalád hat Vanilloid (TRPV1-6) típusú receptora közül az elsőként felfedezett és jellemzett, a TRPA1 receptor pedig az Ankirin alcsalád egyetlen képviselője. Ezek a receptorok elsősorban hátsó gyöki és a trigeminális ganglionokban elhelyezkedő nociceptív primer szenzoros neuronokon, valamint ezek perifériás érzőideg-végződésein (Story és mtsai., 2003; Nagata és mtsai., 2005), továbbá asztrocitákon expresszálódnak (Lee és mtsai., 2016). Szerkezetüket tekintve hat β-redő felépítésű transzmembrán doménből állnak, melyből a két utolsó alegység tetramerizálódva alakítja ki a nem-szelektív kation csatornát. Aktiváció hatására a csatorna megnyílik és Ca²⁺, valamint Na⁺ áramlik a sejtbe, mellyel egyidőben K⁺ áramlik ki, depolarizáció jön létre és az így keletkező akciós potenciál terjed végig a neuronális afferensen (Liu és Simon, 1998). Ezek az intracelluláris folyamatok jelentős szereppel bírnak a fájdalomkeltő neuropeptidek felszabadulásában és így a fájdalom és a neurogén gyulladás modulációja szempontjából (Geppetti és mtsai., 2008). Mindkét receptor C-terminálisán egy "TRP-box" figyelhető meg,

mely egy konzervált aminosav régió, TRPV és TRPA család mellett a TRPC és TRPM családokban is (Choi és mtsai., 2014). Jelentős külöbséget okoz a két receptor felépítésében a TRPA1 receptor N-terminálisán létrejött nagyszámú (14-19) ankirin ismétlődés, mely egyedülálló az élővilágban (Bessac és Jordt, 2008; Chen, 2015) (3. ábra). A receptort is erről nevezték el, ez az ismétlődés okozza feltételezhetően a receptor mechanikai érzékenységét (Kwan és mtsai., 2006; Nilius és mtsai., 2012).

A TRPV1 és TRPA1 receptorok aktivációjában számos endogén és növényi eredetű exogén kémiai anyag vesz részt, melyek kiemelt részét a 1. táblázat foglalja össze. TRPV1 agonisták közül külön említendő a kapszaicin ultrapotens analógja az RTX (Szállási és Blumberg, 1990; 1999; Raisinghani és mtsai., 2005). A TRPV1 receptort továbbá a fájdalmas hőinger (> 43 °C) és az alacsony pH (< 6) is aktiválja (Tominaga és mtsai., 1998; Welch és mtsai., 2000; Bianchi és mtsai., 2006; Nilius, 2007; Szolcsányi 2008; Gavva 2008; Cao és mtsai., 2013). TRPA1 receptor aktivációjában a mechanikai ingerek és fájdalmas hideg inger (<17 °C) is részt vesznek (Story és mtsai., 2003), bár feltételezik, hogy emberben csak hozzájárul a hidegérzet kialakulásához, a hidegallodínia kialakításán keresztül (Kwan és mtsai., 2006, Katsura és mtsai., 2006). Kiemelendő a TRPA1 receptor irritánsai közül a mustárolajban előforduló allilizotiocianát (AITC), mivel képes szelektíven ingerelni a receptort, és így neurogén mechanizmussal gyulladást létrehozni (Inoue és mtsai., 1997; Jordt és mtsai., 2004). Az intracelluláris Ca2+-szint növekedést követően a Ca2+ az N-terminálisan jelenlévő EF-hand doménen keresztül direkt módon képes aktiválni a TRPA1 receptort (Zurborg és mtsai., 2007). Újabb kutatások bizonyítják, hogy szövetkárosodás során és oxidatív stressz hatására keletkező szabad gyökök elektrofil tulajdonságuk miatt szintén direkt módon képesek aktiválni a TRPA1 receptort (Andersson és mtsai., 2008). Fontos gyulladás folyamán felszabaduló endogén agonisták a szemikarbazid-szenzitív amin oxidáz (SSAO) termékei: hidrogén-peroxid, formaldehid és a metilglioxál (Sawada és mtsai., 2008; McNamara és mtsai., 2007; Eberhardt és mtsai., 2012). Kimutatták, hogy hidrogén-szulfid, valamint poliszulfid vegyületek is aktiválják a receptort (Kimura, 2014; Pozsgai és mtsai., 2016). Csatornanyitást okoznak a zsírsav metabolizmus termékei, melyek COX enzim hatására képződnek gyulladásos szignál következtében (Blair, 2006; Taylor-Clark és mtsai., 2008). Jól ismert, hogy a TRPV1 receptor mellett a TRPA1 receptorok jelentős szerepet játszanak az akut és krónikus neurogén gyulladás és a neuropátiás fájdalom kialakulásában (Bautista és mtsai., 2006; Nilius és mtsai., 2012).



3. ábra: TRPA1 receptor felépítése és funkcióért felelős domének, foszforilációs helyek és ligandkötő zsebek (Choi és mtsai., 2014).

TM: transzmembrán domén, LPO: lipid peroxidáció, ANK: ankirin domén, CaM binding: kalmodulin kötő hely, PIP2: foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát, PKC: protein kináz C szubsztrát régiója, TRP box: konzervált aminosav régió, Voltage: feltételezett feszültségszenzitív domén.

A TRPV1 receptoron számos kötőhelyet azonosítottak (4. ábra), aktivációjára jellemző, hogy a lipofil vegyület a membránon átjutva az S3 és S4 transzmembrán domének és az ezeket összekötő hurokrégió által kialakított intracelluláris vanilloid zsebbe kötödik (Jordt és Julius, 2002; Papakosta és mtsai., 2011). A hőérzékelésben fontos aminosavak - N628K, N652T, Y653T - mutációja fájdalmas hőingerre a pórus régió rövidebb ideig tartó nyitását eredményezi (Szolcsányi és Sándor, 2012). Egyes irodalmi adatok alapján a TRPV1 fő aktivátora a magas hőmérséklet, és a receptorhoz kötődő agonisták jelentős része csak a receptor megnyílásához szükséges hőküszöböt csökkenti (Ryu és mtsai., 2008). A csatornarégiót alkotó aminosavak felelősek a hőinger és a protonok által kiváltott aktivációért. A pórusformáló régiót összekötő extracelluláris hurkok szerepet játszanak a protonok hatására bekövetkező, csatornanyitást eredményező konformációváltozásban (Jordt és mtsai., 2000; Myers és mtsai., 2008). Fontos megjegyezni, hogy a TRPV1 pórus két szűkületet tartalmaz: egy tölcsérszerű extracelluláris pórus alkotja a szelektív szűrőt, és felső kapuként működik, míg az alsó kapu az S6 hélix közepén helyezkedik el. Mindkét kapunak egyidejűleg nyitottnak kell lennie, hogy permeábilissá váljon az ionok számára. Az RTX és a kapszaicin az alsó kaput is működteti, és az S5-S6 linkerrel is interakcióba lép.

A TRPV1 receptorok és a membrán lipid raftjainak hidrofób kölcsönhatása szintén modulálja a csatornák nyitási tulajdonságait. A receptort körülvevő lipid környezet eltávolítását követően szelektív módon csökkent a TRPV1 agonisták hatása (Szőke és mtsai, 2010; Sághy és mtsai., 2015).



4. ábra: A TRPV1 receptor szerkezete és aktivációs mechanizmusai szempontjából kiemelt régiók (Szolcsányi és Sándor, 2012).

S1-S6: tanszmembrán alegységek, A: ankirin domén, CaM: kalcium-kalmodulin, PIP₂: foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát, RTX: reziniferatoxin, LPA: lizofoszfatidsav.

TRPV1	TRPA1			
Exogén agonisták				
növényi eredetű vanilloidok:	növényi eredetű vegyületek:			
kapszaicin (Capsicum annuum)	allicin (Allium sativum)			
reziniferatoxin (Euphorbia resinifera)	allil-izotiocianát (Brassica)			
piperin (Piper nigrum)	fahéjaldehid (<i>Cinnamomum verum</i>) (Bandell és mtsai., 2004; Macpherson és mtsai., 2005, 2007)			
eugenol (Eugenia caryophyllata)	gingerol (Zingiber officinale)			
	mentol (Mentha × piperita) timol (Thymus vulgaris)			
zingerol (Zingiber officinale)	karvakrol (Carum carvi)			
(Szállási és Blumberg, 1990; 1999)	tetrahidrokannabinol (Cannabis sativa subs. indica)			
	nikotin (Nicotiana tabacum)			
	(Talavera és mtsai., 2009)			
Endo	gén agonisták			
endokannabioidok: anandamid N-arachidonoil-dopamin (Zygmunt és mtsai., 1999; Smart és mtsai., 2000) nem-kannabioidok: 12-hidroperoxi-eikozatetraénsav N-oleoikdopamin (Chu és mtsai., 2003)	szemikarbazid szenzitiv amin oxidaz termekei: hidrogén-peroxid formaldehid metilglioxál ROS: szuperoxid (Andersson és mtsai., 2008). kénhidrogén (H ₂ S) poliszufidok (H ₂ Sn) (Kimura, 2014; Pozsgai és mtsai., 2016) zsírsav metabolizmus termékei:			
	(Taylor-Clark és mtsai., 2008; Trevisani és mtsai., 2007)			
	gyógyszerhatóanyagok:			
	izoflurán, ketoprofén, glibenkalmid, apomorfin, diklofenak, lidokain			
	környezetszennyező anyagok:			
	acetaldehid, akrolein, ammónium-klorid, nehézfémek (Zn, Cu, Cd)			

1. táblázat: TRPA1 és TRPV1 agonisták

A TRPV1 és TRPA1 receptorok szenzitizációját okozza számos gyulladáskeltő mediátor, mint például a prosztaglandinok és a bradikinin, melyek G-protein-kapcsolt receptorokon keresztül fejtik ki hatásukat, illetve az idegi növekedési faktor (NGF) és tumor nekrózis faktor α (TNFα), melyek tropomiozin receptor kináz A (TrkA) receptoron keresztüli foszforiláció révén hatnak (Bandell és mtsai., 2004; Zhang és mtsai., 2005; Dai és mtsai., 2007; Szolcsányi és Sándor, 2012; Fernandes és mtsai., 2011). A receptorokat érzékenyítik bizonyos protein kinázok (PK) is, melyek különböző mértékben foszforilálják a receptort, így befolyásolva a receptor szenzitivitásának mértékét (Wang és mtsai., 2008). A TRPV1 receptor negatív regulációjában szerepet játszik az N- és a C- terminálison a kalcium-kalmodulin (CaM) (Numazaki és mtsai., 2003), míg a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát (PIP₂) C-terminálison található kötőhelyhez való kötődése okoz aktiváció fokozódást (Ufret-Vincenty és mtsai., 2011). A receptor deszenzitizációját befolyásolja a foszfoprotein foszfatáz 2B (PP2B) gátlása is (Docherty és mtsai., 1996).

IV.4. Gyógyszerfejlesztési lehetőségek

A jelenleg rendelkezésre álló analgetikumok két fő mechanizmus révén fejtik ki hatásukat, egyrész a COX enzimek gátlásával, másrészt az opioid receptorok útján. Ezek a gyógyszerek jó hatásspektrummal bírnak a gyulladás és láz, valamint a traumás és posztoperatív fájdalom kezelésében. Azonban nem mérséklik kellőképp a különböző eredetű krónikus neuropátiás fájdalomállapotokat, illetve tartós alkalmazásukkor súlyos mellékhatások – NSAID: kardiovaszkuláris, gasztrointesztinális és renális betegeségek kialakulása, opioid szerek: légzésdepresszió, pszichés és fizikai dependencia, tolerancia, obstipáció - léphetnek fel. Ilyen esetekben jelenleg az adjuváns analgetikumok – pl.: antiepileptikumok, triciklikus antidepresszánsok, helyi érzéstelenítők - alkalmazása jelenthet alternatívát, bár hosszútávú alkalmazásuk a jelentkező mellékhatások miatt nem lehetséges. A neuropátiás fájdalom kezelésére így új gyógyszerek, sőt más támadáspontú és új hatásmechanizmusú vegyületek fejlesztése vált szükségessé. A fájdalom csillapításának legszelektívebb módja a nociceptorok gátlása, és így a fájdalomszignál kialakulásának megakadályozása lehetne. A TRPV1 és TRPA1 receptorok kiemelkedő fontosságúvá váltak a fájdalomkutatásban. Egyre több agonistát ismerünk meg és számos antagonistát fejlesztenek jelenleg is a receptorműködés gátlására.

A TRPV1 receptor agonisták fejlesztésének két iránya közül az első a deszenzitizáció kialakulását veszi alapul – melyet már a kapszaicin tanulmányozásakor megfigyeltek -, a másik irány a receptor ligandkötésének befolyásolására irányuló fejlesztéseket foglalja magába. Az agonisták közül eddig elsődlegesen a kapszaicin külsőleges alkalmazását lehetővé tevő krémek és tapaszok törtek be a gyógyszerpiacra. Ilyen a Qutenza tapasz (8% kapszaicin hatóanyag), melyet olyan betegek fájdalmának enyhítésére alkalmaznak, akiknél például posztherpetikus neuralgia, illetve HIV-fertőzés vagy diabétesz követkövetkeztében neuropátia alakult ki, vagy bizonyos gyógyszerek alkalmazásakor a bőrfelszíni idegek károsodnak és emiatt neuropátiás fájdalmuk van (Wallace és Pappagallo, 2011). Továbbá fázis II klinikai vizsgálatban az AlgrX-4975 (Adlea) vegyület egyetlen injekciója szignifikánsan csökkentette oszteoartritiszben szenvedő betegek fájdalomszintjét (Walton, 1991; Remadevia és Szallasi, 2008). A Civamid vagy másnéven Zucapsaicin krém formájában szintén alkalmasnak bizonyult az oszteoartritisz és a neuropátiás fájdalom bizonyos szintű csökkentésére (Salat és mtsai., 2014; Schnitzer és mtsai., 2012). Azonban mindezen agonisták alkalmazása során a deszenzitizáció kialakulásáig jelentős fájdalmat kell a betegeknek elszenvedni, így cél volt a fájdalmat kiváltó hatások csökkentése molekuláris farmakológiai megoldásokkal, illetve a fájdalom kialakulását megakadályozó antagonisták fejlesztése került előtérbe. A kapszazepin (CZP) a TRPV1

receptor elsőként leírt kompetitív antagonistája (Bevan és mtsai., 1992), mely nem megfelelő farmakokinetikai tulajdonságai miatt nem került klinikai vizsgálatba, ám molekuláris szerkezete - pontosabban az 1,3-di(arilalkil)tiourea csoportja - alapot adott a további antagonisták fejlesztéséhez (Walker és mtsai., 2003), melyek java részt urea származékok és amidok. Azonban a gyógyszerfejlesztésben a TRPV1 receptoron keresztül ható vegyületek és készítmények fő veszélye, hogy könnyen hipertermia kialakulásához vezetnek, illetve termoszenzitivitási zavarok alakulhatnak ki használatuk során, továbbá a legtöbb vizsgált vegyület nem érte el a kívánt terápiás hatást. Így manapság előtérbe kerültek a TRPA1 receptor gátlását célzó szerek fejlesztése (Baraldi és mtsai., 2010), mely receptor jelentős előnye, hogy bár szerepe van a hőérzékelésben, de csak mint érzékenyítő target vesz részt a 17 °C alatti hőmérséklet érzetének kialakításában (Kwan és mtsai., 2006; Katsura és mtsai., 2006). Továbbá újabb kutatások kimutatták, hogy a TRPA1 receptoron másodlagos jelátviteli molekulák, mint például a Ca²⁺ nélkül, közvetlenül hidegre és a kémiai anyagok hatására is kialakul a konformáció változás és az aktiváció. Humán TRPA1 hidegérzékelő tulajdonságai azonban nem az N-terminálison jelenlévő nagyszámú ankirin ismétlődésen keresztül, hanem azon kívül jönnek létre (Moparthi és mtsai., 2014). A csatorna kapuzási mechanizmusának ilyen fajta - Nterminális ankirin ismétlődéseken kívüli - befolyásolása lehetőséget ad a TRPA1 alapú gyógyszerterápiák finomhangolására.

A TRPA1 receptor szelektív antagonistája a HC030031, mely bizonyítottan gátolja a gyulladás és a mechanikai, valamint termális hiperalgézia létrejöttét (Eid és mtsai., 2008). Kísérleteink során ez a vegyület kiváló kontrollként szolgált. TRPA1 receptoron ható gyógyszeres terápia ígéretes új irányt jelenthet a neuropátiás fájdalom csillapításában.

IV.5. A szemikarbazid-szenzitív amin-oxidáz szerepe a gyulladásban

A szemikarbazid-szenzitív amin-oxidáz (SSAO) enzim számos szövetben és sejttípusban jelen van, membránhoz kötött és plazmában oldott formában (Lyles, 1996). Az enzimet emberben az AOC3 gén kódolja, mely а 17. kromoszómán van jelen (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8639). Expresszióját eddig főként vaszkuláris simaizom és endotél sejtekben, valamint adipocitákban mutatták ki (Salmi és Jalkanen, 2001; Andrés és mtsai., 2001). Az SSAO enzim egyik fő funkciója, hogy részt vesz endogén és xenobiotikus aminok metabolizmusában réz és kinon kofaktor jelenlétében, az aminok oxidatív dezaminációjának katalizálásával, mely folyamat során számos gyulladáskeltő szolubilis melléktermék – például formaldehid, metilglioxál, ammónium és hidrogén-peroxid (H2O2) keletkezik (Yu és mtsai, 2003). A H₂O₂ az adhéziós molekulák, például a P-szelektin expresszióját képes emelni (Johnston és mtsai., 1996), az aldehidek pedig közvetlen keresztkötéseket tudnak létrehozni az endotél sejtek és a leukociták között (Bogdan és mtsai., 2000). Szerepe van továbbá exogén aminok detoxifikálásában (Magyar és mtsai., 2001).

A vaszkuláris adhéziós protein-1 (VAP-1) klónozásakor igazolták, hogy szekvenciája megegyezik az SSAO enzimével (Smith és mtsai., 1998), mindezek alapján elmondható, hogy a gyulladásban leukocita adhéziós és enzimatikus feladatokat egyaránt ellát a molekula. A leukocita extravazáció során irányítja a leukociták interakcióját vaszkuláis endotélsejtekkel (Stolen és mtsai., 2005; O'Sullivan és mtsai., 2004), továbbá enzimatikus funkciója révén részt vesz a leukocita-transzmigráció irányításában (Salmi és mtsai., 1993; Salter-Cid, 2005). Szerepet játszik a vaszkuláris simaizomsejt, az adipocita és a kondrocita differenciációban, a glükóz transzport szabályozásán keresztül (El Hadri és mtsai., 2002; Filip és mtsai., 2016), valamint in vitro kutatások alapján leírták, hogy részt vesz a kötőszöveti mátrix létrehozásában és a vaszkuláris struktúra fenntartásában (Langford és mtsai., 1999; Buffoni és Ignesti, 2000). Számos, főleg gyulladásos eredetű betegségben számoltak be az SSAO enzim emelkedett mennyiségéről és aktivitásról. Ilyenek például a diabétesz (Garpenstrand és mtsai., 1999), gyulladásos szem- és májbetegség (Almulki és mtsai., 2010; Luo és mtsai., 2013; Kurkijärvi és mtsai., 1998), veseelégtelenség (Lin és mtsai., 2008), kongenitális szívelégtelenség (Boomsma és mtsai., 2002), Alzheimer-kór (Unzeta és mtsai., 2007; Valente és mtsai., 2012), szklerózis multiplex (Airas és mtsai., 2006) és az elhízás (Kobarová és mtsai., 2017). Továbbá az SSAO enzim biomarkerként való alkalmazásának lehetőségét már leírták bizonyos betegségekben, így például diabétesz (Yoshikawa és mtsai., 2013), hiperglikémia (Li és mtsai., 2009), stroke (Hernandez-Guillamon és mtsai., 2012), ateroszklerózis (Aalto és mtsai., 2012), bizonyos tumorok (Li és mtsai., 2014), krónikus szívbetegség (Pannecoeck és mtsai., 2015) és epeúti gyulladás (Trivedi és mtsai., 2017) esetében. Mindezen klinikai és *in vivo* kísérletes adatok alapján feltételezhető, hogy az enzimnek citotoxikus metabolitok képződése révén szerepe lehet a fent említett patológiás állapotok kialakulásában vagy annak következményeiben (Dunkel és mtsai., 2008). Tehát az SSAO enzimműködés gátlásával gyulladáscsökkentő hatást érhetünk el, így az SSAO-gátlóknak és azok fejlesztésének terápiás értéke lehet (Salter-Cid és mtsai., 2005). Az SSAO enzim nevét adó gátlószere, a szemikarbazid, és más karbonil aktív vegyületek az enzim elsődlegesen leírt, bár enyhe gátlói. Korai kísérletekkel kimutatták, hogy a 2-butanon oxim hatásos inhibítora a humán szérum SSAO enzimnek (Hiraoka és mtsai., 1988). Az SSAO enzim irreverzibilis gátlószerei az oxim vegyületek, hidrazinszármazékok és allilaminok közül kerülnek ki.

Intenzív kutatások folynak olyan kis molekulás SSAO gátlók kifejlesztésére, melyek vezető molekulává válhatnak a gyulladáscsökkentő gyógyszerek körében. Az új hatásmechanizmusú gyulladáscsökkentők iránti fokozódó igényt jelzi, hogy egyre növekszik az SSAO enzim gátlását célzó vegyületek szabadmainak száma (Wang és mtsai., 2006). Több SSAO gátlóról bizonyították már, hogy rendelkeznek gyulladásgátló hatással (Hiraoka és mtsai., 1988; Mlícková és mtsai., 2001; Salter-Cid és mtsai, 2005; Marttila-Ichihara és mtsai., 2006), azonban klinikai vizsgálatokig ezidáig csak nagyon kevés gyulladásgátlásban hatásosnak tűnő vegyület juthatott el, mivel többségükről kiderült, hogy nem teljesíti a gyógyszerfejlesztés alapvető kritériumait. Így például toxikusak - LJP-1207 és BTT-2052 hidrazinok -, nehezen oldhatók - LJP-1586 allilamin -, vagy széles hatásspektrumúnak - PXS-4159A - bizonyultak (O'Rourke és mtsai., 2008; Foot és mtsai., 2013).

A BTT-1023 vagy timolumab elnevezésű humán monoklonális SSAO-ellen termeltetett antitestről preklinikai radioaktív izotópos vizsgálatok alapján leírták a becsült humán hatásos dózisát (Autio és mtsai., 2013), ezt követően klinikai vizsgálatig jutott. A közelmúltban zárultak le fázis II vizsgálatai, és az "árva drogot" a primer szklerotizáló kolangitisz kezelésére alkalmas vegyületként jellemezték (https://www.acorda.com/products/research-development/btt1023, https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02239211). Ígéretes gyógyszerjelölt a múlt év elejére szintén fázis II vizsgálatig jutott PXS-4728A jelű vegyület, melyről leírták, hogy kulcsmolekula lehet a krónikus obstuktív tüdőbetegség, valamint intersticiális vesefibrózis kezelésében (Jarnicki és mtsai., 2016; Katagiri és mtsai., 2016). Egyszeri orális dózisa több mint 90%-osan gátolja a célenzimét, magas orális biohasznosulásúnak és jól tolerálhatónak bizonyult (Jarolimek és Charlton, 2015), továbbá a vizsgálatok kimutatták, hogy alacsony dózisai (3-10 mg) hatékonyak az enzim hosszú ideig tartó gátlásában, tehát kielégíti a krónikus kezelésre

szánt gyógyszerek ideális követelményeit (http://www.pharmaxis.com.au/productpipeline/amine-oxidase-platform/ssao-inhibitor-pxs4728a/).

Támpontot jelenthet a további SSAO enzim inhibítorainak tervezésekor az enzim topakinon kofaktora, mely a katalítikus folyamatok mediálásában játszik kulcsszerepet. További előnyt jelent az inhibítor tervezésében, hogy már rendelkezésre áll a humán enzim kristályszerkezete (Kaitaniemi és mtsai., 2009).

IV.5.1. Egy új ígéretes SSAO gátló oxim vegyület, az SZV-1287

A Semmelweis Egyetem Szerves Vegytani Intézetének kémikusai kifejlesztettek egy potenciális SSAO gátló vegyületet, az SZV-1287 kódnevű, 3-(4,5-diphenyl-1,3-oxazol-2-yl)propanal oximot (5. ábra), mely szelektíven ható, több támadáspontú gyulladáscsökkentővé vállhat (Mátyus és mtsai., 2010; Mátyus és Chai, 2016). Egy olyan "aktív prodrugot" hoztak létre, melynek specifikus szerkezetéből adódó egyedi tulajdonsága, hogy az önmagában is gyulladáscsökkentő SSAO inhibítorból a szervezetbe kerülve metabolikus bioaktiváció útján a COX enzim gátló oxaprozin oxim analógja képződik (Mátyus és Chai, 2016).

Gyulladáscsökkentő hatását már leírták akut és krónikus *in vivo* modellrendszerekben és feltételezik, hogy a gyulladás korai fázisában a leukocita extravatzáció gátlásával fejti ki hatását (Helyes és mtsai., 2014; Tábi és mtsai., 2013), de pontosabb i*n vitro* hatásmechanizmusáról ismereteink még hiányosak voltak. Az SZV-1287 szerkezeti képlete nagy mértékben hasonlít olyan oxim vegyületek szerkezeti képletéhez, amelyekről már lírták, hogy TRP ioncsatornák aktivációját gátolják (Perner és mtsai, 2009; DeFalco és mtsai, 2010). Így tehát mindenképpen indokolt volt a vegyület TRPV1 és TRPA1 aktivációra kifejtett hatását *in vitro* körülmények között is megvizsgálni. Jelen dolgozatban leírt eredményeinket alapul véve kutatócsoportunk szabadalmat nyújtott be az SZV-1287 vegyületre, gyulladásgátló hatása mellett bizonyították analgetikus hatását krónikus artritisz modellben, majd megkezdtük preklinikai vizsgálatát egy GINOP pályázat keretei között (Horváth és mtsai., 2017).



5. ábra: SZV-1287 szerkezeti képlete

IV.6. Az ösztradiol szerepe a fájdalomban

A fájdalom szexuálszteroidok által modulált (Holdcroft és Berkley 2006), és jól kimutatható nemi különbségek figyelhetők meg a krónikus fájdalom kórképében (Ruau és mtsai., 2012). Számos klinikai tanulmány bizonyítja a nők magasabb szenzitivitását krónikus fájdalomban (Riley és mtsai., 1998; Hurley és Adams, 2008; Fillingim és mtsai., 2009; Von Korff és mtsai., 1988). Magasabb fájdalomküszöb és tolerancia figyelhető meg nőknél a follikuláris fázisban, mint a luteális fázisban (Riley és mtsai., 1999). Továbbá kísérleti adatok bizonyítják, hogy rágcsálóknál magasabb szenzitivitás figyelhető meg nőstényeknél, ami szintén függ az ösztrusz ciklustól (Lacroix-Fralish és mtsai., 2006) (6. ábra). Leírták, hogy az ösztrogének különböző pro- és antinociceptív hatást váltanak ki neuronális és nem-neuronális mechanizmusok révén, lassú genomikus úton (Kumar és mtsai., 2015). Az ösztrogén receptorok (ER) expresszálódnak a nocicepciót közvetítő területeken, mind a centrális, mind a perifériás idegrendszer területén. Az ERα és ERβ receptorok expresszálódnak a primer szenzoros neuronokon, elsődlegesen a kis és közepes átmérőjű nociceptorokon (Papka és mtsai., 2002). A 17β-ösztradiol (E2) hatást fejt ki szenzoros neuronok ERa receptorain, a fájdalom közvetítés modulálásán keresztül (Bereiter és mtsai., 2005). A klasszikus nukleáris ER-ok mellett a membránban lokalizálódott G proteinkapcsolt ösztrogén receptor (GPER1) szintén jelen van a primer szenzoros neuronokon (Dun és mtsai., 2009; Lu és mtsai., 2013), és bizonyították, hogy a gerincvelői szomatoszenzoros rendszeren keresztül gyors, nem-genomikus E2 szignalizációjú fájdalom modulációt eredményez (Takanami és mtsai., 2010).



6. ábra: Ösztradiol és progeszteron szint változása rágcsálóban az ösztrusz ciklus során (Miller és Takahashi, 2014).

Primer szenzoros neuronokon kimutattak ER és TRPV1 receptorok közötti kölcsönhatásokat, mely mechanizmus potenciális magyarázat lehet a nemek közti fájdalomérzet különbségekre.

Az E2 közvetlenül növeli a nociceptor ingerlékenységét, csökkentve az akciós potenciál küszöbértékét, és elősegíti a TRPV1 aktivációt primer szenzoros neuronokon (Flake és mtsai., 2005; Diogenes és mtsai., 2006). Számos faktor - mint például az NGF - TRPV1 szenzitizáló hatását kimutatták, mely a TrkA receptor szignalizációján keresztül hat (Zhang és mtsai., 2005). Klinikai tanulmányok kimutatták, hogy a nők a kapszaicin által kiváltott fájdalmat intenzívebbnek érzik, mint a férfiak (Gazerani és mtsai., 2005). Továbbá a TRPV1 receptorok száma jelentősen csökkent ERα és ERβ génhiányos egerekben (Cho és Chaban, 2012), ami arra utal, hogy az ösztrogén részt vesz a TRPV1 receptor expressziójának szabályozásában is. Ezek az adatok arra utalnak, hogy az E2 fontos szabályozója lehet a TRPV1 mediálta nocicepciónak, mindezidáig azonban kevés figyelmet szenteltek a nemi különbségekre és az E2 TRPV1 receptoron keresztüli mechano- és termonociceptív hatásaira.

V. Célkitűzés

A neurogén gyulladás csökkentése és a neuropátiás fájdalom terápiája mindmáig nem kielégítő, mivel nem áll rendelkezésünkre olyan szer, mely analgetikus hatását már kifejtve nem befolyásolja a többi érzékelő funkciót és nem okoz szedációt vagy eufóriát, illetve ne alakulna ki vele szemben tolerancia. Ezért fontos új targetek felkutatása és olyan molekulacsoportok vizsgálata, melyek potenciális célpontjai és hatóanyagai lehetnek új mechanizmussal ható gyógyszerek fejlesztésének. Így TRP csatornák befolyásolásán keresztül ható új molekulák vizsgálatát tűztük ki célul, melyekkel szemben tolerancia nem alakul ki és mellékhatások tekintetében is kedvezőbbek lehetnek a jelenlegi terápiás szereknél. Továbbá vizsgálni kívántuk a fájdalomban jelentkező nemi különbségek okát és mechanizmusát a TRPV1 receptor működésének pontosabb megismerése érdekében.

Ezért kutatómunkám célkitűzései a következők voltak:

- 1. Az SZV-1287 vegyület TRPA1 és TRPV1 receptor aktivációjára kifejtett hatásának vizsgálata primer szenzoros neuronok sejttestjein és perifériás idegvégződésein, valamint TRPA1 és TRPV1 receptor-expresszáló CHO sejteken *in vitro* módszerekkel.
- 2. Az ösztradiol TRPV1 receptor működését befolyásoló hatásának vizsgálata *in vivo* állatkísérletes modellekben C57BL/6J vad típusú és TRPV1^{-/-} egereken.
- 3. Az ösztradiol TRPV1 receptorok működésére kifejtett hatásának vizsgálata, szenzoros neuron tenyészeten *in vitro* módszerekkel.

VI. Kísérleti modellek és vizsgálati módszerek

VI.1. Kísérleti modellek

VI.1.1. Kísérleti állatok és kezelésük

A kísérleteinkben 20-30 g súlyú, 8-10 hetes nőstény és hím C57BL/6J vad típusú (WT) egereket és TRPV1 génhiányos (TRPV1^{-/-}) egereket használtuk (Jackson Laboratories, Egyesült Államok). Az állatokat a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetének állatházában tenyésztettük és tartottuk (5-10 egér/ketrec) standard méretű (160x137x330 mm) műanyag ketrecekben 23-25°C-on, 12 órás sötét-világos ciklusban, a táplálék és az ivóvíz ellátásuk *ad libitum*.

A nőstények egyik csoportján bilaterális ovariektomizálást (OVX, n=8) végeztünk avertin anesztéziában 1,9% tribromoethanol és 1,2% amyl-hydrate fiziológiás sóoldatban oldva; 0,1 ml 10 g testsúlyra). Az egerek 14 nappal a műtétet követően E2 (33 ng/g s.c.; 0.1 ml etil-oleátban oldva; Sigma, Budapest, Magyarország) kezelést kaptak. Korban megfelelő álműtött egerek szolgáltak kontrollként.

Minden vizsgálat és kísérleti eljárás eleget tett az állatok védelméről és kíméletes felhasználásáról szóló 1998. évi XXVIII. törvénynek és az állatkísérletek végzéséről szóló 40/2013 (II. 14.) számú kormányrendelet előírásainak, valamint a Nemzetközi Fájdalom Társaság (IASP) ajánlásainak.

VI.1.2. Primer szenzoros neuron kultúra hátsógyöki ganglionból (DRG) és trigeminális ganglion (TRG) sejtjeiből

A primer szenzoros neuron tenyészet 2-4 napos C57BL/6J WT egerek DRG-jából illetve 1-4 napos Wistar patkányok TRG-jából készítettük. A ganglionokat steril, hideg foszfát-pufferben (PBS) preparáltuk, majd 37 °C-on 35 percig kollagenázt (Type XI, 1 mg/ml) tartalmazó PBS oldatban, majd 8 percig dezoxiribonukleáz I-et (1000 units/ml) tartalmazó PBS oldatban inkubáltuk. A Ca²⁺ és Mg²⁺ mentes PBS oldattal való mosást követően triturálással szétválasztottuk az idegdúcok sejtjeit. A sejtkultúrát poly-D-lizinnel (100 µg/ml) bevont üveg fedőlemezekre szélesztettük, és a következő tápoldatban növesztettük: 180 ml alacsony glükóztartalmú Dulbecco's-Modified Eagle Medium (D-MEM), 20 ml lószérum, 20 ml szarvasmarha albumin, 2 ml inzulin-transzferrin-szelenium-S, 3,2 ml putreszcin-dihidroklorid

(100 µg/ml), 20 µl trijód-tironin (0,2 mg/ml), 1,24 ml progeszteron (0,5 mg/ml), 100 UN/ml penicillin, 100 µg/ml sztreptomicin, 200 ng/ml idegi növekedési faktor (NGF).

A tenyészetet 37 °C-os termosztátban, 5%-os CO₂ tartalmú közegben tartottuk fenn, és minden másnap NGF-et adtunk a sejtekre (200 ng/ml). A kísérletekhez 1-3 napos tenyészeteket használtunk (Szőke és mtsai., 2000).

VI.1.3. TRPV1 és TRPA1 receptor-expresszáló sejtvonalak

Vizsgálataink során TRPV1 és TRPA1 receptort stabilan expresszáló CHO sejtvonalakat használtunk, melyeket Dr. Sándor Zoltán állított elő egy korábbi közleményében leírt protokollnak megfelelően (Sándor és mtsai., 2005).

VI.2. Vizsgálati módszerek

VI.2.1. Intracelluláris Ca²⁺ koncentráció mérés mikrofluorimetriával

Az egy-két napos TRG és DRG sejttenyészetet 30 percig 37 °C-on 1 μM fluoreszcens Ca²⁺ indikátor fura-2-acetoxi-metilészter (fura-2-AM) (Molecular Probes) festékkel inkubáltuk. A fluoreszcens festék, miután az intracelluláris térben nem specifikus észterázok lehasítják róla az acetoxi-metilészter csoportot, képessé válik a szabad Ca²⁺ megkötésére. A mérés alapelve, hogy a Ca²⁺ kötött festék abszorpciós maximuma 340 nm, míg a szabad festéké 380 nm, így ezen két hullámhosszon gerjesztve a mért területen a sejteket, az emittált fényintenzitások hányadosából ki tudjuk számolni a Ca²⁺ koncentrációját. A festék bekötődését követően 5 percig extracelluláris oldattal (ECS) mostuk a tenyészetet, melynek összetevői (mM-ban kifejezve): NaCl (160), KCl (2,5), CaCl₂ (1), MgCl₂ (2), HEPES (10), glükóz (10); pH 7,3. Az ECS és a tesztoldat külön csövekből való adagolása a tenyészetre egy hármas kivezetésű gravitációs gyors perfűziós csőrendszeren keresztül történt (VC-77SP, Warner Instrument Corporation, Harvard Apparátus GmbH, Németország). A sejtmentes területekről nyert adatok felhasználásával meghatároztuk a hátteret. A sejtekben ECS áramoltatása folyamán detektált raciómetrikus értéket nullának vettük, majd ehhez viszonyítottuk a tesztoldatok adása folyamán mért ráciometrikus maximum (R_{max}) értékeket.

Ezzel a technikával határoztuk meg a kapszaicin- (CAPS) és mustárolaj (AITC)-kiváltotta kalcium áramokat TRG és DRG neuronokon (Szőke és mtsai., 2000). A vizsgálatokat Olympus BX50WI fluoreszcens mikroszkóppal végeztük, a felvételeket Olympus LUMPLAN FI/x20 0.5 W vízimmerziós objektívvel és számítógéphez kapcsolt digitális kamerával (CCD, SensiCam PCO, Germany) készítettük. Minden látótérről maximálisan 12, jól festődött sejtet választottunk ki a fluorszcenciájuk egyedi megfigyelésére. A sejteket tehát felváltva 340 és 380 nm hullámhosszú fénnyel világítottuk meg, melyet monokromátorral (Polychrome II., Till Photonics, Németország) állítottunk elő, Axon Imaging Workbench 2.1 (AIW, Axon Instruments, CA) rendszer irányításával. Az emittált fényt 510 nm hullámhosszon detektáltuk, és a rációmetrikus értéket (R=F340/F380), azaz a két hullámhosszon gerjesztett fluoreszcencia intenzitás arányát folyamatosan monitoroztuk. Az R értéket az AIW 2.1 szoftver generálta, az adatokat Microcal Origin 7.0 szoftver használatával dolgoztuk fel (Originlab Corp. Northampton, USA).

A kísérletek során CAPS (330 nM) és AITC (200 μM), TRPV1 és TRPA1 receptor agonistákat alkalmaztuk. Az első kísérletsorozatban SZV-1287 (100, 500 és 1000 nM) és LJP 1207 (1000

nM) hátását vizsgáltuk a CAPS és az AITC aktivációra. Az első kísérleti elrendezésben a perfúziós berendezéssel közvetlenül a sejtekre juttattuk a vizsgált vegyületünket 1 percen keresztül, majd ezt követően alkalmaztuk a megfelelő agonistát. A második kísérleti elrendezésben egy órán át inkubáltuk az SZV-1287 fent leírt koncentrációival a TRG tenyészetet és ezután a mérőkamrába helyezve vizsgáltuk az agonisták trigeminális neuronsejteken kifejtett hatását. Továbbá a tradicionális TRPA1 antagonista HC030031 (10 μ M) és a TRPV1 antagonista CZP (10 μ M) hatását is vizsgáltuk.

A második kísérletsorozatban a neuronokat 100 pM, illetve 1 nM E2-vel inkubáltuk egy éjszakán át (14 óra) 37 °C-os termosztátban 5 % CO₂ tartalom mellett, illetve kezeletlen kontrollokat is használtunk. Ötször ismételt CAPS (330 nM) stimulációt (10 sec) alkalmaztunk és az egyes stimulusok között 10 perces mosási periódust tartottunk. Másik vizsgálat során rövid, 10 percig tartó E2 kezelést, illetve E2 és AG879 kettős kezelést alkalmaztunk a 3. CAPS adást követően. A reagáló sejtek arányát, valamint a kalcium válaszok nagyságát is vizsgáltuk.

VI.2.2. Radioaktív ⁴⁵Ca²⁺-felvétel vizsgálatok

A radioaktív ⁴⁵Ca²⁺-felvétel vizsgálatok előnye a mikrofluorimetriás Ca²⁺ mérésekkel szemben, hogy számos sejt együttes reakciójából nyerünk információt, ezzel elkerülve az egyedi sejtreakciók heterogenitását. A kalcium izotóppal végzett kísérletekhez Wood és munkatársai 1988-ban megjelent cikkét vettük alapul (Wood és mtsai., 1988).

A TRPA1 és TRPV1 receptor-expresszáló CHO sejteket 72-lyukú plate-en tenyésztettük 15 μl DMEM tápoldatban, egy lyuk körülbelül 4000 sejtet tartalmazott. A kezelést megelőzően a sejttenyészetet ötször Ca²⁺-mentes Hank féle oldattal (100 mM NaCl, 5 mM HEPES, 5 mM KCl, 4 mM NaHCO₃, 10 mM glükóz, 30 mM NaH₂PO₄.H₂O, 30 mM KH₂PO₄; pH 7,4) mostuk. Ezt követően 200 µCi/ml ⁴⁵Ca²⁺ izotóppal (1,3 Ci/mM) és Hank féle oldatban oldott tesztoldattal inkubáltuk a sejteket. Majd ECS oldattal történő ötszöri mosást követően a plate-t 75 °C-os termosztátba helyeztük, a folyadék maradéktalan eltávolítása érdekében. Ezután nátrium-dodecil-szulfáttal lizáltuk a sejteket, az általuk akkumulált izotóp koncentrálása érdekében. A lizátumot szintillációs folyadékba helyeztük, majd Packard Tri-Carb 2800 TR számlálóval mértük a radioaktivitását, percenkénti beütésszámban kifejezve.

TRPA1 expresszáló CHO sejtvonalon SZV-1287 100 nM és 500 nM, 1, 5 és 10 μM-os koncentrációjával 60 percig 37 °C-on inkubáltuk a sejteket, majd 200 μM AITC-vel váltottuk ki a sejtek izotóp felvételét. Az SZV-1287 előbbiekben leírt koncentrációit alkalmaztuk TRPV1

expresszáló CHO sejteken is, ahol az aktiválást CAPS-nel végeztük (330 nM). Az így kapott értékeket kezeletlen kontrollok izotóp felvételéhez hasonlítottunk.

VI.2.3. CGRP felszabadulás mérése radioimmunoassay (RIA) módszerrel izolált patkány trachea érzőideg-végződéseiből

A trachea nagymértékben innervált kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződésekkel, és mivel ezek közel helyezkednek el a felszínhez, kiválóan alkalmas modellszerv a perifériás szenzoros neuropeptidek stimulációra történő felszabadulásának mérésére (Helyes és mtsai, 2001).

A patkány tracheákat thiopentál (50 mg/kg i.p.) altatást követően kipreparáltuk, majd oxigenizált 37 °C-os Krebs oldatot (pH 7,2) tartalmazó szervfürdőben egy órán át perfundáltuk, a neuropeptid szint egyensúlyi állapotának elérése érdekében (7. ábra). Majd az oldatot lecserélve 8 perces Kerbs oldatos inkubálást alkalmaztunk, mely az első, prestimulációs frakciót képezte, mely kontrollként szolgált a következő fázishoz. Ezt követte a 8 perces stimulációs periódus, mely során SZV-1287 illetve LJP 1207 (100, 500 és 1000 nM), vagy ezek oldószerét alkalmaztuk. A második 8 perces inkubálás alatt - melyből a stimulációs frakciót nyertük - a kémiai aktiválást a TRPA1 agonista AITC-vel (100 μM) illetve a szelektív TRPV1 agonista CAPS-nel (100 nM) végeztük. A harmadik 8 perces inkubáció során ismét Krebs oldatot önmagában alkalmazva kaptuk meg a posztstimulációs frakciót, azaz ingerlés hatásaként utólag jelentkező CGRP felszabadulást (Németh és mtsai., 1996, Helyes és mtsai., 1997; Németh és mtsai., 1998; Helyes és mtsai., 2001).

A CGRP koncentrációkat a szervfürdőkből vett 200 µl térfogatú mintákból RIA módszerrel meghatároztuk. A légcsöveket lemérve a CGRP felszabadulás mértékét fmol/mg nedves szövetsúlyra vonatkoztatva fejeztük ki. Az abszolút peptidfelszabadulás meghatározásához a stimulálciós és a posztstimulálció frakciókban mért CGRP-felszabadulás együttes értékéből kivontuk a bazális prestimulációs frakcióból mért CGRP koncentrációt (Németh és mtsai., 1998). Minden csoport méréseit három független kísérletben ismételtük meg (n=18/csoport).



7. ábra: Trachea perfúziós rendszer vázlata. (forrás: Sághy Éva, PhD tézis 2016)

VI.2.4. mRNS expresszió vizsgálat valós-idejű kvantitatív polimeráz láncreakcióval (qPCR)

A totál RNS izolálása kezelt és kezeletlen DRG sejtekből TRI reagenssel (Molecular Research Centre. Inc., Cincinatti, OH, USA) és Direct-Zol RNS kittel történ, a gyártó utasításainak megfelelően. Az RNS mintákat Dnasel (Zymo Research, Irvine, CA, USA) kezelést követően kvantifikáltuk spektrométerrel (NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies Inc., Wilmington DE, USA). 1 µg tisztított RNS-t reverz transzkripcióval komplementer DNS-sé (cDNS) alakítottuk (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) MaximaTM First Strand cDNA Synthesis Kit használatával (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). A qPCR-t Stratagene Mx3000P QPCR System-mel végeztük (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), referencia génként glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenázt (GAPDH) használtunk. Minden reakcióban 20 ng cDNS-t használtunk, 1x Luminaris HiGreen Low ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific)-et alkalmaztunk és 0,3 µM-t mindegyik primerből. A qPCR ciklusok a következők voltak: 95°C 10 perc, melyet 40-szer 95°C 30 másodperces ciklus követett, majd 30 másodpercig 60 °C, majd 72°C 1 percig. A qPCR rekciókhoz a következő primereket használtuk: Gapdh (sense): 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3' és (antisense): 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'; Trpv1 (sense) 5'-ATGCTGGGTCATTTCTCCCC-3' és (antisense) 5'-AGCGTACCCCCACTTTCTCT-3'; G protein-kapcsolt ösztrogén receptor 1 (GPER1) (sense): 5'-CACCTGGATGAGCTTCGACA-3' és (antisense): 5'-TGCACCGCTGTGAAGGG-3'; ösztrogén $(ER\alpha)$ (sense): 5'receptor alfa

AGCTGTCTCCTTTCCTGCAC-3' and (antisense): 5'-TTAGACCTGTAGAAGGCGGGA-3'; ösztrogén receptor β (ER β) (sense) 5'-TGTTACTAGTCCAAGCGCCAA-3' és (antisense) 5'-ACCAGACACCGTAATGATACCC. Valamennyi valós-idejű PCR kísérletet háromszoros ismétlésben végeztük, és az átlagértékeket használtuk az mRNS expresszió szintjének a meghatározásához. A mérések tartalmazták a disszociációs görbe analízist, az amplifikáció specifitásának igazolására. A relatív génexpressziós rátát a $\Delta\Delta$ Ct érték kiszámításával állapítottuk meg, amihez a kezeletlen állatok mintáját vettük alap értéknek. A génexpressziós arány kiszámításánál a primer hatásfokot vettük figyelembe (Pfaffl és mtsai., 2001). A kísérlet során a neuronokat egy éjszakán át 37 °C-on inkubáltuk 100 pM vagy 1 nM E2-vel, 5% CO₂ tartalom mellett, illetve kezeletlen kontrollokat használtunk.

VI.2.5. Mechanonociceptív küszöbérték mérése eszteziométerrel



8. ábra: Dinamikus plantáris eszteziométer (Ugo Basile)

A mechanonociceptív küszöbértéket a hátsó lábak talpi felszínének érintési érzékenységével határoztuk meg, dinamikus plantáris eszteziométer (DPA, Ugo Basile 37400, Comerio, Olaszország) használatával (8. ábra). Az állatok egy alul lyukacsos rácslapon,

plexi dobozokban szabadon mozoghatnak, a stimulus így alulról éri a talpukat. Egy 30 perces habituációs periódust követően, a mechanikai ingerlést az elhárító reakcióig (láb elrántása) növeltük, majd a védekező reakciókor mért mechanonociceptív küszöbértéket grammban rögzítettük. Az egereket maximálisan 10 g erőhatásnak tettük ki, egy tompa hegyű fokozatosan emelkedő (2g/s) erőhatást kifejtő stimuláló egységgel.

VI.2.6. Termonociceptív küszöbérték mérése emelkedő hőmérsékletű forró lappal

A termonociceptív küszöbértéket a hátsó lábak talpi felszínének hőérzékenységével határoztuk meg, emelkedő hőmérsékletű forró lap (IITC Life Science Woodland Hills, CA, Egyesült Államok) használatával (9. ábra). A fájdalomérzetet kiváltó hőmérséklet elérésekor az állat megrázza, majd megnyalja a hátsó végtagjait. Ekkor a hőmérséklet emelkedést rögtön leállítjuk, és azt a hőmérsékletet °C-ban rögzítjük, mikor az állat nocifenzív reakciót mutatott (hátsó talp megnyalása, megrázása). A végső kikapcsolási érték 53 °C.

14 napon keresztül minden reggel, ugyanabban az időszakban mértük a mechanonociceptív- és a termonociceptív küszöbértékeket, a WT és TRPV1^{-/-} hím és nőstény egerek csoportjain (n=8/csoport).



9. ábra: Emelkedő hőmérsékletű forró lap (IITC Life Sciences)

VI.2.7. Kenetminta meghatározása

A mechano- és termonociceptív küszöbérték méréseket követően az ösztrusz ciklus fázisait hüvelyi kenetvétellel határoztuk meg a kísérlet 14 napján keresztül, azonos időpontokban. Az az ösztrusz ciklus négy fázisának elkülönítésekor a következő publikációkat vettük alapul: Mettus és Rane, 2003; Caligioni, 2009; Byers és mtsai., 2012 (10. ábra).



10. ábra: Az ösztrusz ciklus 4 fázisát reprezentáló mikroszkópos kenetminták. Három sejttípus azonosítható: nukleáris epithélsejtek (fehér nyíl) elszarusodott epithélsejtek (fekete nyíl) és leukociták (kör). A fázisok sorrendben: proösztrusz (A), ösztrusz (B), metösztrusz (C), diösztrusz (D). (Byers és mtsai., 2012)

VI.2.8. TRPV1 agonista RTX indukálta gyulladásos hiperalgézia vizsgálata

Akut neurogén gyulladást és ennek következtében létrejövő hiperalgéziát hoztunk létre jobb hátsó mancsban, TRPV1 agonista RTX (0,01 µg/ml) intraplantáris adásával (Helyes és mtsai., 2003). Egy csoportban az RTX injektálást megelőzően E2 kezelést alkalmaztunk (33 ng/g s.c.). Egy előző tanulmányunkban kutatócsoportunk leírta, hogy 33 ng/g E2 gyorsan (15 percen belül) indukálja a CREB foszforilációt a központi idegrendszerben (Abraham és mtsai., 2003), így a mechanociceptív küszöbérték mérését 10 perc, 30 perc, 1 óra és 2 óra után végeztük az intraplantáris RTX adást követően.

VI.3. Statisztikai analízis

A statisztikai analízishez GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, La Jolla, CA) szoftvert használtunk. Az SZV-1287 és LJP 1207 vegyületek mikrofluorimetriás vizsgálata esetén Fisher-egzakt tesztet alkalmaztunk. ⁴⁵Ca²⁺ izotóp felvételt mérő vizsgálatuknál Dunnett féle post hoc tesztel kiegészített egyutas ANOVA-t végeztünk. Ezen vegyületek RIA eredményeinek kiértékelésekor Student t-tesztet használtunk.

Az E2 hatást vizsgáló kalcium mérés eredményeit és a qPCR adatokat átlag±SEM értékkel fejeztük ki, három független kísérlet eredményiből. A génexpresszió és az E2 hatásának mikrofluorimetriás meghatározására Bonferroni féle post hoc teszttel kiegészített egyutas ANOVA-t használtunk.

Az *in vivo* tesztek eredményeit csoportonként 8 állat eredményeiből kapott átlag±SEM értékeit egyutas ANOVA-val analizáltuk, melyet szintén Bonferroni féle post hoc teszttel egészítettünk ki. A mechanikai hiperalgézia vizsgálatakor a csoportok közti különbségeket kétutas ANOVA-val fejeztük ki, Bonferroni féle post hoc tesztel kiegészítve. A szignifikancia szintek: * p <0,05, ** p <0,01 és *** p <0,001.
VII. Eredmények

VII.1. SZV-1287 TRPA1 és TRPV1 ioncsatornák aktivációjára kiváltott hatásának vizsgálatái eredményei

VII.1.1. Az SZV-1287 gátolja a TRPA1 receptor által közvetített Ca²⁺-beáramlást TRG sejttenyészet neuronjaiba

A TRPA1 agonista AITC-re (200 μ M) reagáló neuronok százalékos arányát fluoreszcens Ca²⁺beáramlás mérésével határoztuk meg a kontroll plate-eken. Az AITC-re adott válasz körülbelül fél percig tartott, és hosszabb latencia (30 sec) után alakult ki. Kontroll körülmények között az AITC által kiváltott Ca²⁺-influxot a sejtek 27,38±3,99%-ánál (213 neuronból 58 reagáló) detektáltuk (11. A ábra). Az SZV-1287 hatására koncentráció–függő módon és szignifikánsan csökkent a Ca²⁺-beáramlás TRG neuronok citoplazmájába. A reagáló sejtek aránya AITC hatására az SZV-1287 100, 500 és 1000 nM koncentrációjának jelenlétében 18,95±3,67% (51ből 10), 18,7±4,39% (55-ből 10), és 1,93±2,2% (165-ből 3) volt (11. A ábra).

Annak megerősítésére, hogy a TRPA1 részt vesz a Ca²⁺-beáramlás létrejöttében, egy TRPA1 szelektív antagonistát, a HC030031-et használtunk 10 μ M koncentrációban. Az AITC a neuronok 25,36±3,88%-ánál (74-ből 19 sejt) okozott Ca²⁺-beáramlást, a HC030031 és AITC együttes alkalmazásakor szignifikánsan csökkent az AITC hatására kialakuló válasz, 3 sejt reagált 69-ből, ami csupán 4,35% (11. B és D ábra). A Ca²⁺ mérés során készített eredeti regisztrátumok a 11. ábra D, E és F részén láthatók.

A kísérlet második részében egy szerkezetében jelentősen eltérő referencia SSAO gátló vegyületet, az LJP 1207-et alkalmaztuk annak felderítésére, hogy az SZV-1287 hatása a TRPA1 aktivációra az SSAO gátló hatásához kapcsolódik-e. Az LJP 1207 (1000 nM) azonban nem volt hatással a TRPA1 aktivációra. Az első AITC-expozíció után a sejtek 20,25±2,52% (113-ból 23) válaszolt Ca²⁺-beáramlással, és ez az érték közel azonos volt 19,24±3,96% -kal (113-ból 22), az AITC és LJP 1207 együttes adását követően (11. B és F ábra). Az SZV-1287 és LJP 1207 oldószerei nem okoztak változást a Ca²⁺-beáramlásban. A válaszoló sejtek százalékos aránya az AITC és az oldószerek együttes adásakor 24,01±4,3% volt (41-ből 10).



11. ábra: SZV-1287 hatása TRPA1 receptor aktivációjára, TRG neuron tenyészeten.

(A) SZV-1287 (100, 500 és 1000 nM) hatása AITC (200 μM) által kiváltott TRPA1 receptor aktivációra,
 ***p<0,001 (vs. AITC; Fisher-egzakt teszt), n=51–213 sejt/csoport.

(B) HC030031 (10 μM) és LJP 1207 (1000 nM) hatása AITC (200 μM) által kiváltott TRPA1 receptor aktivációra, ***p<0,001 (vs. AITC; Fisher-egzakt teszt), n=44–113 sejt/csoport.</p>

(C) Fura-2-AM festékkel feltöltött TRG neuron tenyészet képei intracelluláris Ca²⁺-mérés során, AITC kezelés előtt (felül) és után (alul).

(**D**–**F**) Eredeti regisztrátumok, (D) AITC és AITC+HC030031-, (E) AITC+SZV-1287 (1000 nM)- és (F) AITC+ LJP 1207 (1000 nM) -indukálta Ca²⁺-beáramlás trigeminális neuronokon. A két hullámhosszon gerjesztett fluoreszcencia intenzitás arányát az idő függvényében mértük. Hasonló csökkenés volt megfigyelhető az aktiválódott sejtek arányában 60 perces SZV-1287 előinkubálást követően. Az AITC alkalmazása után az emelkedő SZV-1287 koncentrációval történő előinkubálás csökkenést okozott a reagáló sejtek arányában (27,93±4,98% (51-ből 14), 9,67±1,23% (56-ból 6) és 7,23±2,19% (56-ból 4)) (12. ábra).



12. ábra: Az SZV-1287 előinkubálásának hatása az AITC által kiváltott Ca²⁺beáramlásra.

Az SZV-1287 100, 500 és 1000 nM-jának 60 perces előinkubációját követően 200 μ M AITC kiváltotta Ca²⁺ - beáramlás. ** p <0,01, *** p <0,001 (AITC vs. AITC + 500 és 1000 nM SZV-1287, reagáló sejtek vs. nem reagáló sejtek, Fisher-egzakt teszt).

VII.1.2. Az SZV-1287 gátolja a TRPV1 receptor által közvetített Ca²⁺-beáramlást TRG sejttenyészet neuronjaiba

A hosszabb ideig tartó és hosszabb idő alatt kialakuló AITC hatással ellentétben, a CAPS (330 nM) adását követően rövid időn belül (10 sec) Ca²⁺-beáramlás volt megfigyelhető. Kontroll körülmények között a CAPS-nel kiváltott Ca²⁺-beáramlást a sejtek 60,83±3,87%-ában (89-ből 55) detektáltuk. A CAPS és a 100, 500 és 1000 nM koncentrációjú SZV-1287 együttes adásakor a kalciumválasz koncentráció-függő csökkenést mutatott. A reagáló sejtek aránya: 46,82±7,66% (51-ből 24), 29,32±5,48% (53-ból 16) és 0% (87-ből 0) volt (13. A ábra). A TRPA1 szelektív antagonista HC030031 nem volt hatással a CAPS által kiváltott kalciumválaszra, míg a CZP gátolta a választ.

Hasonlóan ahhoz, mint amit a TRPA1 stimulációkor megfigyeltünk, az LJP 1207 nem volt hatással a TRPV1 aktivációra. Az első CAPS által okozott fluoreszcencia változás az idegsejtek $55,49 \pm 3,95\%$ -ánál (47-ből 26) volt megfigyelhető, és ez az érték nem változott az LJP 1207 adása után sem (13. B ábra). A Ca²⁺ mérés során készített eredeti regisztrátumok a 13. ábra D, E és F részén láthatók.

Az SZV-1287 és LJP 1207 oldószerei nem okoztak változást a Ca²⁺-beáramlásban. A CAPS és az oldószer együttes adására reagáló sejtek százalékos aránya 55,81±4,25% volt (43-ból 24).





(A) SZV-1287 (100, 500 és 1000 nM) hatása CAPS (330 nM) által kiváltott TRPV1 receptor aktivációra,
 p<0,01; *p<0,001 (vs. CAPS; Fisher-egzakt teszt), n=51–89 sejt/csoport.

(**B**) CZP (10 μM), HC030031 (10 μM) és LJP 1207 (1000 nM) hatása CAPS (330 nM) által kiváltott TRPV1 receptor aktivációra, **p<0,01 (vs. CAPS; Fisher-egzakt teszt), n=47–81 sejt/csoport.

(C) Fura-2-AM festékkel feltöltött TRG neuron tenyészet képei intracelluláris Ca²⁺-mérés során, CAPS kezelés előtt (felül) és után (alul).

(**D–F**) Eredeti regisztrátumok, (D) CAPS és CAPS+HC030031-, (E) CAPS+1000 nM SZV-1287- és (F) CAPS+1000 nM LJP 1207-indukált Ca²⁺-beáramlás trigeminális neuronokon. A két hullámhosszon gerjesztett fluoreszcencia intenzitás arányát az idő függvényében mértük.

Az SZV-1287 azonos koncentrációival történő 60 perces előinkubálását követően az intracelluláris Ca²⁺-beáramlás koncentráció-függő csökkenést okozott, a CAPS-re válaszoló sejtek aránya 100 és 500 nM SZV-1287 kezelés után: 38,54±4,58% (55-ből 21 és, 3,53±3,32% (51-ből 2), 1000 nM a választ eltörölte (14. ábra).



14. ábra: Az SZV-1287 előinkubálásának hatása a CAPS által kiváltott Ca²⁺beáramlásra.

Az SZV-1287 100, 500 és 1000 nM-jának 60 perces előinkubációját követően 330 nM CAPS-kiváltotta Ca²⁺ - beáramlás. * p <0,05, *** p <0,001 (CAPS vs. CAPS + 100, 500 és 100 nM SZV-1287, reagáló sejtek vs. nem reagáló sejtek, Fisher-egzakt teszt).

Az SZV-1287 szelektivitását a TRPA1 és TRPV1 csatornákra úgy teszteltük, hogy megvizsgáltuk az SZV-1287 feszültségfüggő kalciumáramokra gyakorolt hatását 50 mM KCl alkalmazásával. A neuronok 98,33±2,88%-ánál (50-ből 49-nél) KCl hatására fluoreszcens jelet detektáltunk, és ez az érték nem változott 1000 nM SZV-1287 adását követően sem (15. ábra).



15. ábra: Az SZV-1287 hatása a KCl által kiváltott Ca²⁺- beáramlásra.

Ca²⁺-csúcsok KCl (50 mM), majd KCL és SZV-1287 (1000 nM) együttes adását követően, fura-2-AM festékkel feltöltött trigeminális neuronok tenyészetén.

VII.1.3. Az SZV-1287 csökkenti a TRPA1-indukálta CGRP-felszabadulást perifériás érzőideg végződésekből

A CGRP felszabadulása 100 μ M AITC-stimulációra növekedett a bazális felszabadulási értékhez képest, 0,10±0,06-ról 0,52±0,09-re fmol/mg szövetsúlyra vonatkoztatva. Az SZV-1287 szignifikánsan és koncentráció-függő módon gátolta az AITC aktiváció által kiváltott CGRP felszabadulást a magasabb koncentrációkban. SZV-1287 100, 500 és 1000 nM-os alkalmazását követően a CGRP felszabadulása 0,39±0,11, 0,37±0,09 és 0,23±0,06 fmol/mg értékre csökkent (16. A ábra).

A TRPV1 aktiválása 100 nM CAPS-nel 0,68±0,16 fmol/mg CGRP-felszabadulást indukált, amelyet az SZV-1287 nem csökkentett jelentősen. Az értékek 100, 500 és 1000 nM SZV-1287 alkalmazását követően: 0,74±0,16, 0,66±0,16 és 0,55±0,13 fmol/mg nedves szövetre vonatkoztatva (16. C ábra).

Az SZV-1287 oldószere nem befolyásolta a CGRP-felszabadulást, sem pedig az AITC és CAPS oldószerei. Továbbá az SZV-1287 önmagában nem befolyásolta a bazális, nem stimulált peptid kiáramlást.

Az LJP 1207 nem volt szignifikáns hatással a TRPA1 és a TRPV1 aktiváció által kiváltott CGRP felszabadulásra (16. B és D ábra).



16. ábra: SZV-1287 és LJP 1207 (100, 500 és 1000 nM) hatása TRPA1 és TRPV1 receptor aktiváción keresztül történő CGRP felszabadulásra.

(A) SZV-1287 és (B) LJP 1207 hatása, AITC (100 μM) által kiváltott CGRP felszabadulásra. **p<0,01;
***p<0,001 ((A) vs. 1000 nM SZV-1287 kontroll, ill. (B) oldószeres kontroll; Student t-teszt), ##p<0,01 (vs. AITC, Student t-teszt), n=6 preparátum/csoport.

(C) SZV-1287 és (D) LJP 1207 hatása, CAPS (100 nM) által kiváltott CGRP felszabadulásra. ***p<0,001 ((C) vs. 1000 nM SZV-1287 kontroll, ill. (D) oldószeres kontroll; Student t-teszt) n=6 preparátum/csoport.

VII.1.4. Az SZV-1287 gátolja az AITC- és a kapszaicin által indukált Ca²⁺-beáramlást és ⁴⁵Ca²⁺ izotóp felvételt TRPA1 és TRPV1 expresszáló CHO sejtekbe

Kontroll körülmények között 200 μ M AITC által kiváltott Ca²⁺-influxot a TRPA1 receptor expresszáló sejtek 96%-ában (544-ből 523) detektáltunk. SZV-1287 1, 5 és 10 μ M koncentrációjának 60 perces előinkubálását követően a TRPA1 expresszáló CHO sejtekbe az intracelluláris kalciumbeáramlás koncentráció függő módon csökkent: 57,63±3,72% (491-ből 283), 43,31±1,9% (260-ból 110) és 15,66±2,23% (415-ből 65) (17. A ábra).

A kontroll lemezeken 330 nM CAPS-nel kiváltott TRPV1 receptoron keresztüli Ca²⁺-beáramlást a sejtek 97%-ában (205-ből 199) figyeltünk meg. Az SZV-1287 1, 5 és 10 μ M koncentrációjának 60 perces előinkubálását követően a TRPV1 expresszáló CHO sejtek stimuláció hatására történő Ca²⁺ felvétele mindhárom koncentráció esetetében hasonlóan jelentős mértékben csökkent (60,51±3,28%-ra (248-ból 160), 58,51 6,08% -ra (323-ból 189-) és 64,7±3,52%-ra (221-ből 143) (17. B ábra).

Az SZV-1287 100 nM, 500 nM, 1, 5 és 10 μ M-ja a ⁴⁵Ca²⁺ izotóp felvételét koncentráció-függő módon, szignifikánsan csökkentette (17. C és D ábra). A hatóanyag IC₅₀ értéke TRPA1 receptorra 2,39 μ M, míg TRPV1 receptorra 8,64 μ M, a radioaktív ⁴⁵Ca²⁺ felvételt mérő kísérletek alapján.



17. ábra: SZV-1287 hatása AITC- és CAPS-indukálta Ca²⁺-beáramlásra ill. ⁴⁵Ca²⁺-felvételre, TRPA1 és TRPV1 expresszáló CHO sejtvonalakon.

(A-B) SZV-1287 (1, 5 és 10 μM) hatása, AITC (200 μM) és CAPS (330 nM) által kiváltott Ca²⁺-beáramlásra, intracelluláris Ca²⁺-méréssel. **p<0,01, ***p<0,001 ((A) vs. AITC, (B) vs. CAPS, reagáló sejtek %-os aránya; Fisher ekzat-teszt), n=205-544 sejt/csoport.</p>

 $(\textbf{C-D}) SZV-1287 (100 nM, 500 nM, 1, 5 és 10 \mu M) hatása, (C) AITC (200 \mu M) és (D) CAPS- (330 nM) indukálta ^{45}Ca^{2+}-felvételre. *p<0.05, **p<0.01; ***p<0.001 (vs. 0 M SZV-1287, Egyutas ANOVA, Dunnett féle post hoc teszt).$

VII.1.5. Eredmények összefoglalása

- Az SZV-1287 hatására koncentráció-függő és szignifikáns módon csökken a TRPV1 és TRPA1 receptorok aktivációja TRG neuronok tenyészetében.
- TRPA1 és TRPV1 receptort expresszáló CHO sejtvonalakon az SZV-1287 különböző koncentrációi jelentősen csökkentették mindkét receptor stimuláció hatására létrejövő aktivációját, mind mikrofluorimetriás Ca²⁺ méréssel, mind pedig radioaktív ⁴⁵Ca²⁺ felvétel méréssel vizsgálva.
- Perifériás érzőideg-végződéseken a TRPV1 receptor aktivációt követő neuropeptid felszabadulást nem, de TRPA1 aktivációt követő CGRP felszabadulást az SZV-1287 legnagyobb alkalmazott koncentrációja szignifikánsan csökkentette (2. táblázat).
- 4. TRG neurontenyészetet az SZV-1287 különböző koncentrációival előinkubálva mindkét vizsgált receptor aktivációja szignifikánsan csökkent (3. táblázat).
- Az eltérő szerkezetű, de szintén SSAO gátló vegyület, az LJP 1207 nem volt hatással a TRPA1 és TRPV1 receptorok aktivációjára, sem a szenzoros neuronok sejttestjein, sem pedig az érzőideg-végződéseken.
- 6. Az SZV-1287 nem gátolta a feszültségfüggő kalciumcsatornák aktivitását.

módszer	kísérleti modell	SZV-1287	eredmény aktivációra	
		koncentráció (µM)	TRPA1	TRPV1
mikrofluorimetriás Ca ²⁺ mérés	TRG neuronok	0,1	-	-
		0,5	-	\downarrow
		1	\checkmark	\downarrow
	TRPA1/V1 exp. CHO sejtek	1	\downarrow	\downarrow
		5	\downarrow	\downarrow
		10	\downarrow	\downarrow
RIA - CGRP felszabadulás mérés	trachea idegvégződések	0,1	-	-
		0,5	-	-
		1	\checkmark	-
Radioaktív ⁴⁵ Ca ²⁺ felvétel vizsgálat	TRPA1/V1 exp. CHO sejtek	0,1	\downarrow	\downarrow
		0,5	\downarrow	\downarrow
		1	\checkmark	\downarrow
		5	\downarrow	\downarrow
		10	\checkmark	\downarrow

2. táblázat: SZV-1287 különböző koncentrációinak hatása TRPA1 és TRPV1 receptorok aktivitására, különböző kísérleti modellekben.

módszer	kísérleti modell	SZV-1287 koncentráció (µM)	eredmény aktivációra	
			TRPA1	TRPV1
mikrofluorimetriás Ca ²⁺ mérés			60 min előinkubálás	
	TRG neuronok	0,1	-	\downarrow
		0,5	\downarrow	\downarrow
		1	\downarrow	\downarrow

3. táblázat: SZV-1287 különböző koncentrációinak 60 perces előinkubálásának hatása TRPA1 és TRPV1 receptorok aktivitására, mikrofluorimetriás Ca²⁺ méréssel vizsgálva.

VII.2. Az E2 TRPV1 ioncsatorna aktivációra kiváltott hatásának vizsgálati eredményei

VII.2.1. Nemi hormon függő különbségek az egerek mechano- és termonociceptív küszöbértékében

A fájdalomérzetben mutatkozó esetleges nemi különbségek vizsgálatához mindkét nem mechanonociceptív és a termonociceptív küszöbértékeit megmértük.

Megfigyeltük, hogy a proösztrusz fázisban lévő C57BL/6J WT nőstény egerek hátsó mancs talpi felszínén mérve mind a mechano-, mind a termonociceptív küszöbértékek szignifikánsan alacsonyabbak, mint az ösztrusz fázisban lévő nőstény, valamint a hím egerek küszöbértékei. A proösztusz fázisban a legmagasabb az egerek ösztrögén szintje, míg ösztrusz fázisban ez a szint hirtelen lecsökken. Mechanonociceptív küszöbértékek: proösztrusz nőstény: 7,62±0,15, ösztrusz nőstény: 8,31±0,04, hím: 8,47±0,14; termonociceptív küszöbértékek: proösztrusz nőstény: 44,51±0,53, ösztrusz nőstény: 46,76±0,31, hím: 46,79±0,54 (18. ábra).



18. ábra: A nemi különbségek hatása WT egerek mechanonociceptív- és hőküszöbére.

Egyutas ANOVA statisztikai analízist alkalmaztunk, Bonferroni féle multiplex összehasonlító post hoc teszttel, értékek feltűntetése: átlag±SEM, n=8/csoport. WT, ösztrusz és proösztrusz fázisban lévő nőstények és hímek mechanonociceptív (A) és termonociceptív küszöbértéke (B) (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk az ösztrogén expozíció élettani hatásait a fájdalomérzetre, a különböző ösztrusz fázisban lévő intakt nőstény egerek termo- és mechanonociceptív küszöbértékeit összehasonlítottuk bilaterálisan OVX egerek küszöbértékeivel. Ezek a küszöbértékek magasabbak voltak OVX egereknél, és szignifikánsan

alacsonyabbak álműtött egereknél proösztrusz és ösztrusz fázisban. A fájdalomküszöb értékei magasabbak voltak ösztrusz, mint proösztrusz fázisban. Mechanonociceptív küszöbértékek: álműtött proösztrusz nőstény: 7,3±0,17, álműtött ösztrusz nőstény: 7,9±0,12, OVX: 8,6±0,09. Termonociceptív küszöbértékek: álműtött proösztrusz nőstény: 45,62±0,44, álműtött ösztrusz nőstény: 46,99±0,35, OVX: 49,57±0,15 (19. ábra).



19. ábra: OVX és álműtött egerek mechanonociceptív- és hőküszöbértékei ösztrusz ciklus különböző fázisaiban.

Egyutas ANOVA statisztikai analízist alkalmaztunk, Bonferroni féle multiplex összehasonlító post hoc teszttel, értékek feltűntetése: átlag±SEM, n=8/csoport. OVX, álműtött ösztrusz és proösztrusz fázisban lévő egerek mechanonociceptív (**A**) és termonociceptív küszöbértéke (**B**) (***p<0,001 (vs. OVX), #p<0,05; ##p<0,01 (vs. álműtött ösztrusz fázisú nőstények).

VII.2.2. Nemi hormon függő különbségek nem figyelhetők meg a nocicepcióban TRPV1 génhiányos egereknél

A TRPV1 receptor szerepének vizsgálatához meghatároztuk TRPV1 génhiányos (TRPV1^{-/-}) egerek mechano- és termonociceptív küszöbértékét. TRPV1^{-/-} egereknél is hasonló mechanoés termonociceptív küszöbértékeket mértünk, mint a WT hímek és ösztrusz fázisban lévő nőstények esetén (WT egerek - mechanonociceptív küszöbérték: ösztrusz nőstények: 8,31±0,04, hímek: 8,47±0,14, termonociceptív küszöbérték: ösztrusz nőstények: 46,76±0,3, hímek: 46,79±0,54 és TRPV1^{-/-} egerek - mechanonociceptív küszöbérték: ösztrusz nőstények: 8,57±0,7, hímek:8,98±0,07, termonociceptív küszöbérték: ösztrusz nőstények: 47,92±0,44, hímek: 48,52±0,39). TRPV1^{-/-} egerek esetén azonban a nociceptív paraméterekben ösztrusz és proösztrusz fázis között nem volt megfigyelhető különbség, ugyanakkor a hímek mechanonociceptív küszöbértéke magasabb volt a nőstényekénél. A proösztrusz nőstények, az ösztrusz nőstények és a hímek mechanonociceptív küszöbértékei: 8,49±0,08, 8,57±0,07 és 8,98±0,07 voltak, míg a termonociceptív küszöbértékek 48,11±0,38, 47,921±0,45 és 48,52±0,39 (20. ábra).



20. ábra: A nemi különbségek hatása TRPV1 génhiányos egerek mechanonociceptív és hőküszöbére.

Egyutas ANOVA statisztikai analízist alkalmaztunk, Bonferroni féle multiplex összehasonlító post hoc teszttel, értékek feltűntetése: átlag±SEM, n=8/csoport. TRPV1^{-/-} hímek és nőstények (ösztrusz és proösztrusz fázisban) mechanonociceptív (**A**) és termonociceptív küszöbértéke (**B**) (**p<0,01; ***p<0,001).

VII.2.3. TRPV1 aktiváció-indukálta mechanikai hiperalgézia fokozódás E2 hatására

Az E2 TRPV1 receptorok aktivációjára kifejtett hatásának *in vivo* vizsgálatára TRPV1 agonista RTX adást alkalmaztunk OVX egereken, melyet az egyik csoportban E2 adás előzött meg. Jelentős mechanikai hiperalgézia alakult ki intraplantáris RTX (0,01 ng/ml) beadást követően, mind az E2 előkezelt, mind a kezeletlen állatok csoportjainál, a fiziológiás sóoldatot kapott állatokhoz képest. Az E2 előkezelt csoportban a beadás után 10 perccel az 52,8%-os mechanikai küszöbérték csökkenési maximumot követően fokozatos emelkedés volt megfigyelhető a 120 perces vizsgálati időszak során. Szignifikáns különbség volt azonban megfigyelhető E2 előkezelt és kezeletlen, majd RTX injektált állatok csoportjai között, az E2 kezelés megnövelte a nociceptív választ 30 perc után, amint azt a hiperalgézia görbe lefelé történő eltolása mutatja, ami E2-indukált TRPV1 szenzibilizálót sugall. A sóoldat talpba történő injektálása nem okozott mechanikai hiprealgéziát (21. ábra).





Kétutas ANOVA statisztikai analízist alkalmaztunk, Bonferroni féle multiplex összehasonlító post hoc teszttel, értékek feltűntetése: átlag±SEM, n=8/csoport. **p<0,01; ***p<0,001 (RTX kezelt vs. E2 előkezelt, majd RTX kezelt csoport). ### p<0,001 (E2 előkezelt, majd fiziológiás sóoldattal kezelt vs. RTX kezelt csoport). \$p<0,01 \$\$\$p<0,001 (fiziológiás sóoldattal kezelt vs. RTX kezelt csoport).

VII.2.4. ERa, ERβ, GPER1 és TRPV1 mRNS expresszió primer szenzoros neuronokon

Annak tisztázása érekében, hogy a primer szenzoros neuronok expresszálnak-e ösztrogén receptorokat (ER) megvizsgáltuk ERα, ERβ és GPER1 mRNS expresszióját WT egerekből készített hátsó gyöki ganglion (DRG) kultúrákban (n=3 sejtkultúrából készítve). Mindhárom mRNS típust kimutattuk a kultúrában (22. ábra).



22. ábra: ERα, ERβ és GPER1 mRNA expresszió egér uteruszban és DRG-ben.

(A) ERα, ERβ és GPER1 mRNA expressziójának szintje egér uterusban és DRG-ben. (B) ERα, ERβ és GPER1 mRNA expresszió DRG-ben qRT-PCR-ral.

Megfigyeltük, hogy egy napos 100 pM koncentrációjú E2 kezelés szignifikáns, 15-szörös expresszió-növekedést okozott, míg az 1 nM-os koncentráció nem volt hatással a TRPV1 mRNS mennyiségére (23. ábra).



23. ábra: Az E2 hatása TRPV1 relatív génexpressziójára primer szenzoros neuron tenyészetben.

Statisztikai analízisként kétutas ANOVA-t alkalmaztunk, Bonferroni féle multiplex összehasonlító post hoc teszttel. Az értékeket átlag±SEM tüntettük fel, n=8/csoport, ***p<0,001 (vs. kontroll).

VII.2.5. Az E2 fokozza a kapszaicin által kiváltott TRPV1 aktivációt primer szenzoros neuron tenyészetben

Az E2 TRPV1 receptorok aktivációjára gyakorolt hatásának *in vitro* vizsgálatára DRG neuronokból készített primer tenyészetet CAPS-nel kezeltünk, és a CAPS által kiváltott kalcium-beáramlást fluoreszcens intracelluláris kalcium koncentráció méréssel vizsgáltuk.

A TRPV1 agonista CAPS (330 nM) nagy mértékű tranziens Ca^{2+} -beáramlást okoz a sejtekbe (64 reagáló sejt a 120-ból; 53%, R-érték átlaga: 0,59±0,06), amit deszenzitizáció követ (második CAPS adást követően a csúcs: R=0,31±0,05, majd egyre cökken) (24. ábra A, B). Az oldószeres kontroll önmagában nem okozott Ca^{2+} -beáramlást. A DRG neuronok egy napos 100 pM-os E2 előkezelése megszüntette a CAPS által kiváltott TRPV1 receptorok deszenzitizációját (24. ábra C).



24. ábra: Egy napos E2 kezelés hatása kapszaicin indukálta TRPV1 aktivációra.
(A) Fura-2 festékkel feltöltött neuronok CAPS adás előtt (bal) és után (jobb). Reprezentatív Ca-imaging képek (karikázva – a mérés helye). (B) Két DRG neuron reprezentatív regisztrátuma, melyen a CAPS (330 nM) adások sora láthatók (nyilakkal jelezve). (C) Két DRG neuron reprezentatív regisztrátuma, melyen a CAPS (330 nM) adások sora láthatók (nyilakkal jelezve) 100 pM E2 jelenlétében.

Egy másik kísérleti elrendezésünkben öt egymást követő stimulációt ugyanazon neurontenyészeten alkalmaztunk, egy 50 perces periódus alatt. Először 10 másodperces CAPS (330 nM) stimulációt alkalmaztunk, mely tranziens Ca²⁺-akkumlációt okozott a citoszólban, melyet a fluoreszcens jel növekedésével detektáltunk (R=0,55±0,06), majd a CAPS adását egy 10 perces kimosási periódust követően ismételtük meg. A második és a harmadik válasz mértéke fokozatosan csökkent (R=0,33±0,06 and R=0,27±0,06), a TRPV1 receptor deszenzitizációja miatt. Ezt követően egy rövid (10 perces), 100 pM koncentrációjú E2 kezelés után a negyedik CAPS adáskor megfigyeltük, hogy az E2 megakadályozza a deszenzitizácót (R=0,46±0,05), de egy következő, E2 nélküli CAPS adás szignifikánsan kisebb választ eredményezett (R=0,2±0,04) (25. ábra A, B).

A kísérletsorozat harmadik részében az első és a második CAPS adást követően (R=0,82 \pm 0,06 és R=0,61 \pm 0,05) 10 perces E2 kezelést együtt alkalmaztuk egy TrkA receptor gátló szer (AG879, 5 μ M) adásával. Ebben az esetben a harmadik CAPS okozta válasz szignifikánsan kisebb volt (R=0,34 \pm 0,06), mely a TRPV1 deszenzitizáció fennmaradására utal (25. ábra C, D).



25. ábra: Kapszaicin okozta TRPV1 aktiváció primer szenzoros neuron kultúrában, rációmetrikus kalcium koncentráció méréssel.

(A) E2 hatása CAPS indukálta Ca²⁺-beáramlásra. Az R=340/380 érték emelkedését a fura-2 fluoreszcens festékkel feltöltött neuronokon mértük. ***p<0,001; NS=nem szignifikáns (vs. caps1, egyutas ANOVA, Bonferroni féle multiplex összehasonlító post hoc teszt, n=20) ###p<0,001 (vs caps+E2, egyutas ANOVA, Bonferroni féle multiplex összehasonlító post hoc teszt, n=20). (B) E2 hatása CAPS indukálta Ca²⁺-beáramlásra. Eredeti intracelluláris Ca²⁺-mérés regisztrátum, ahol a CAPS adások (nyilakkal jelölve) és E2 inkubáció hatása (vonallal jelölve) látható. (C) E2 és AG879 hatása CAPS indukálta Ca²⁺-beáramlásra. Az R=340/380 érték emelkedését a fura-2 fluoreszcens festékkel feltöltött neuronokon mértük. ***p<0,001 (vs. caps1, egyutas ANOVA, Bonferroni féle multiplex összehasonlító post hoc teszt, n=20). (D) E2 és AG879 hatása CAPS indukálta Ca²⁺-beáramlásra. Az R=340/380 érték emelkedését a fura-2 fluoreszcens festékkel feltöltött neuronokon mértük. ***p<0,001 (vs. caps1, egyutas ANOVA, Bonferroni féle multiplex összehasonlító post hoc teszt, n=20). (D) E2 és AG879 hatása CAPS-indukálta Ca²⁺-beáramlásra. Eredeti intracelluláris Ca²⁺-mérés regisztrátum, ahol a CAPS adások (nyilakkal jelölve) és E2+AG 879 inkubáció hatása (vonallal jelölve) látható.

VII.2.6. Eredmények összefoglalása

In vivo eredmények:

- A vad típusú proösztrusz fázisban lévő nőstények mechano- és termonociceptív küszöbértéke alacsonyabb a hímekénél, és az ösztrusz fázisban lévő nőstények küszöbértékeinél egyaránt.
- 2. OVX nőstények mechano- és termonociceptív küszöbértékei magasabbak voltak mind ösztrusz, mind proösztrusz fázisban lévő álműtött nőstények értékeinél.
- A TRPV1^{-/-} hímek mechanikai fájdalomküszöb értékei magasabbnak mutatkoztak, viszont érdekes módon a TRPV1 génhiányos nőstények és a hímek hőmérsékleti fájdalomküszöb értékei között nem mutatkozott különbség.
- 4. OVX állatoknál exogén ösztradiol hatására mechanikai hiperalgézia jön létre.

In vitro eredmények:

- 5. ERα, ERβ és GPER1 ösztrogén receptorok expresszálódnak primer szenzoros neuronokon.
- Alacsonyabb koncentrációjú (100 pM) E2 kezelés szignifikáns TRPV1 expressziónövekedést okozott, míg a magasabb (1 nM) koncentráció nem volt hatással a TRPV1 mRNS mennyiségére.
- E2 fokozza a TRPV1 aktivációját primer szenzoros neuron tenyészetben, továbbá az E2-vel történő mind hosszútávú (1 napos), mind pedig rövidtávú (10 perces) kezelés megszüntette a stimulációval kiváltott TRPV1 deszenzitizációt.
- 8. TRPV1 receptor deszenzitizációját az E2 megszűntette, ezt a hatást TrkA receptor antagonista adása felfüggesztette.

VIII. Megbeszélés, következtetések

VIII.1. Az SZV-1287 TRPV1 és TRPA1 antagonista hatása

Az eredetileg az SSAO enzim gátlására kifejlesztett 3-(4,5-difenil-l, 3-oxazol-2-yl)propanal oxim vegyület, az SZV-1287 hatását vizsgáltuk a TRPA1 és TRPV1 receptorok aktivációjára, szenzoros neuronok sejttestjein és a perifériás idegvégződésein. Elsőként bizonyítottuk, hogy az SZV-1287 mindkét kationcsatornára potens antagonista hatást fejt ki. Jelentősen és koncentráció függő módon csökkentette az AITC és a CAPS által indukált Ca²⁺-beáramlást a trigeminális neuronokba, de nem volt hatással a feszültségfüggő kalciumáramokra. A referencia SSAO gátló LJP 1207 vegyület, melynek szerkezete nagyban eltér az SZV-1287 szerkezetétől, nem változtatta meg a TRPA1 és a TRPV1 receptorok aktivációját, ami azt mutatja, hogy az SZV-1287 hatásai függetlenek az SSAO gátló hatásától.

A trachea kiváló modellrendszer a perifériás idegvégződéseken a TRPA1 és TRPV1 receptorok aktivációs mechanizmusainak vizsgálatához, mivel sűrűn beidegzett és az idegvégződések közel helyezkednek el a felszínhez, így könnyen aktiválhatók kémiai anyagokkal. Az ennek hatására felszabaduló neuropeptidek kiváló indikátorai az aktivációnak (Helyes és mtsai., 2001). Az SZV-1287 szignifikánsan és koncentrációfüggő módon gátolta a TRPA1 receptor aktiváció által indukált CGRP-felszabadulást, azonban ellentétben a sejttesteken kapott eredményekkel, ez a gátlás nem volt szignifikáns TRPV1 receptor aktiváció esetén. Bár további vizsgálatokra van szükség a TRPV1 receptor neuronális sejttesteken és idegvégződéseken mutatkozó aktivációs különbségek pontos molekuláris mechanizmusainak feltárására, feltételezzük, hogy a sejttest és az idegvégződések eltérő felépítése áll a háttérben. A sejttesten ugyan a CAPS elindított egy kisebb mértékű Ca²⁺-beáramlást, de az endoplazmatikus retikulum gyorsan akkumulálta a citoplazma szabad kalcium-ionjait. Az idegvégződéseken viszont ugyanilyen mértékű receptor aktiváció elegendő lehet a CGRP felszabadulás kiváltásához, mivel itt nincs jelen endoplazmatikus retikulum és Golgi-készülék (Messlinger, 1996). Ezt

alátámasztják kutatócsoportunk korábbi kísérletei is, ahol a TRPV1 receptorok kapuzó mechanizmusait ismertettük ezeken a struktúrákon (Szőke és mtsai., 2010).

A TRPA1 antagonisták többsége kovalens kötés révén módosítja a cisztein-származékokat a csatorna amino-terminális tartományában (Cebi és Koert, 2007). Több oxim származék TRPA1 receptor aktivációt gátló hatásáról számolt már be az irodalom. Az AP18 ((Z)-4-(4-klórofenil)-3-metil-but-3-én-2-oxim) például gátolta a humán és egér TRPA1 receptor aktiválódását, de nem blokkolta a TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4 és TRPM8 receptorokat (Petrus és mtsai., 2007). DeFalco és munkatársai leírták, hogy az AP18 egyik származéka, a 3-metil-4-fenilbut-3-én-2-one-oxim a TRPA1 ioncsatornák kovalens modulátoraként működik és így a TRPA1 receptor antagonistája (DeFalco és mtsai., 2010). Perner és munkatársai kísérleteik során (heteroaril)alkenon-oxim származékokat (pl. (Z)-4-(4-klorofenil)-3-metilbut-3-én-2-oxim) alkalmaztak TRPA1 antagonistaként több betegségmodellben (Perner és mtsai., 2009). Emellett vizsgálták TRPA1 antagonisták szerepét kemoterápia indukált neuropátiás fájdalomban és diabéteszes neuropátiában (Barrière és mtsai., 2012; Vander Jagt, 2008). A TRPA1 ioncsatorna szerepét számos betegségmodellben dokumentálták, és mint fájdalomcsillapító gyógyszercélpont egyértelműen azonosított (Garrison és mtsai., 2011). Garrison és Stucky beszámolt a TRPA1 receptor szerepéről krónikus fájdalom kialakulásában, komplett Freundadjuváns által indukált ízületi gyulladásos modellben (Garrison és Stucky, 2014). Kimutatták, hogy a TRPA1 receptornak szerepe van a migrén (Benemei és mtsai., 2013), az asztma és a krónikus obstruktív tüdőbetegség (Nesuashvili és mtsai., 2013; Grace és mtsai., 2014), a kolitis (Yang és mtsai., 2008; Kun és mtsai., 2014), az ótvar (Lieu és mtsai., 2014) és a hólyaggyulladás (DeBerry és mtsai., 2014) kialakulásában is. A TRPA1 receptort, mint targetet és a TRPA1 antagonistákat, mint a gyógyszerfejlesztés potenciális jelöltjeit tehát alaposan vizsgálták.

Számos tanulmány írja le, hogy a TRPA1 jelentős koexpressziót mutat a TRPV1 receptorral trigeminális szenzoros neuronokon, durális afferensek alpopulációjában és a nem neuronális szövetekben is, továbbá számos tanulmány szerint a TRPV1 és a TRPA1 receptorok integratív szerepet játszanak a nociceptor funkció szabályozásában (Akopian és mtasi., 2007; Salas és mtsai., 2009; Patil és mtsai., 2010; Nilius és Szallasi, 2014). Ez a szinergikus funkció vezetett minket a két csatorna együttes vizsgálatára ugyanazon modellrendszeren.

Összefoglalva, az új oxim komponensünk, az SZV-1287 egy potens TRPA1 és TRPV1 antagonista, primer szenzoros neuronokon, valamint receptorokat expresszáló sejtvonalakon. Ezért ígéretes új jelöltje lehet neuropátiás fájdalomra, migrénre és ízületi gyulladásra fókuszáló gyógyszerfejlesztésnek.

VIII.2. Az ösztradiol fájdalomban betöltött szerepe

Elsőként szolgáltattunk bizonyítékot arra, hogy az E2 érzékenyíti a TRPV1 receptort közvetlen mechanizmusok révén, valamint a TrkA receptor útján indirekt módon, továbbá a TRPV1 receptor expressziójának megnövelésével. Ezek az eredmények magyarázzák a nemi különbségeket a nocicepcióban, valamint a hormonciklus függő fájdalomérzet változást.

Közismert, hogy a TRPV1 receptor kulcsszerepet játszik a fájdalom közvetítésében (Bölcskei és mtsai., 2005; Pogatzki-Zhan és mtsai., 2005; Nilius és Szállási, 2014) és egyes adatok kapcsolatot mutatnak az E2 hatások és a TRPV1 receptor között. Ezek a tanulmányok a TRPV1 receptor aktivációjának fokozódását mutatták ki exogén E2 adást követően, de ezt a kölcsönhatást nem vizsgálták még átfogó kísérleti megközelítéssel, és a mechanizmusa sem volt tisztázott.

Elektrofiziológiai adatokat prezentáltak már arra vonatkozóan, hogy az ösztrogén elősegíti a TRPV1 közvetítette ionáramokat patkány szenzoros neuronokban (Chen és mtsai., 2004). Továbbá a TRPV1 kiváltott nocifenzív válaszok kifejezettebbek voltak nőstény patkányokban, mint hímekben, mely nemi különbséget az E2 közvetítésének tulajdonítják (Lu és mtsai., 2009). Ezt támasztják alá eredményeink is, melyek szerint szignifikánsan nő az RTX által kiváltott hiperalgézia OVX egerekben, exogén E2 adásának hatására. Összhangban a kutatási eredményekkel a klinikai adatok szintén leírják, hogy a nők a CAPS által kiváltott fájdalmat intenzívebbnek érzik, mint a férfiak, feltehetően a TRPV1 receptor nemi hormonok általi eltérő modulációjának köszönhetően (Gazerani és mtsai., 2005). Leírták, hogy az E2 alkalmazása fokozza a nociceptorok excitabilitását, csökkenti az akciós potenciál kialakulásához szükséges küszöböt, valamint elősegíti a TRPV1 aktivációját szenzoros neuronokban (Flake és mtsai., 2005; Diogenes és mtsai., 2006). Kísérleteinkkel kimutattuk, hogy primer szenzoros neuron kultúra E2-vel (100 pM) való egy éjszakán keresztüli inkubálása nemcsak az érzékenységét, hanem az expresszióját is növelte a TRPV1 receptoroknak, hasonlóan az endometrium sejtekéhez (Pohóczky és mtsai., 2016). Valamint a primer szenzoros neuronok expresszálják az ERα, ERβ és GPER1 ösztrogén receptorokat. Bár ebben a mechanizmusban résztvevő ER-ok típusa nem meghatározott, valószínű, hogy az E2 változtatja meg a TRPV1 expesszióját a primer szenzoros neuronokban, az ösztrogén receptorokon keresztül. Bár az egy napos 1 nMos E2 kezelés tekinthető farmakológiai kezelésnek, ennek a koncentrációnak nem volt hatása a kísérletünkben. Számos publikáció írja le, hogy az E2 farmakológiai dózisa csökkenti az ERok kifejeződését a neuronokban (Martins és mtsai., 2015; Treen és mtsai., 2016). Feltételezhető, hogy az ER-ok expresszió csökkenése hozzájárul az E2 csökkent hatásához TRPV1 receptorokon, ami a megfigyelt inverz koncentráció-függő hatásokhoz vezet. A kultúrákban megtalálható gliasejtek mediálhatják az E2 bizonyos hatásait, de csak kevés tanulmány foglalkozik a szatellita sejtek és az ösztrogén receptorok kapcsolatával. Szatellita gliasejtekben eddig csak ERa-t figyeltük meg, ERB-t nem (Puri és mtsai., 2011). Ezeket az in vitro eredményeket alátámasztja, hogy E2 adás növeli az állkapocs ízületi fájdalmat, a TRPV1 expressziójának növelésével az ízületi hártyában, elsősorban nőstény egereknél (Wu és mtsai., 2015). Hasonlóképpen az exogén E2 adása növeli a TRPV1 expresszióját OVX patkányok szenzoros neuronjaiban, míg E2-hatás hiánya ERαKO és ERβKO egerekben TRPV1 expresszió csökkenést eredményez (Cho és Chaban, 2002).

VIII.2.1. Az E2 lehetséges hatásmechanizmusa fájdalomban

Korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan (Dun és mtsai., 2009; Lu és mtsai., 2013; Takanami és mtsai., 2010) mi is kimutattuk, hogy mindhárom ösztrogén receptor (ERα, ERβ és GPER1) expresszálódik primer szenzoros neuronokon. Mind a 10 perces, mind az egy napos E2 kezelés eltörölte a CAPS-okozta TRPV1 deszenzitizációt. Ezek alapján az E2-nek a TRPV1-re gyakorolt hatása valószínűleg magában foglalja a klasszikus genomikus és a gyors, nem klasszikus GPER1 által közvetített hatást a protein kináz C (PKC) jelátviteli útvonalon

keresztül. Eredményeink bizonyítják, hogy 30 perccel az E2 beadása után a TRPV1 aktiváció által indukált mechanikai hiperalgézia növekedés figyelhető meg, ami GPER1 által közvetített gyors szenzitizáció révén jön létre. Ezen eredményünket egy nemrégiben megjelent publikáció is alátámasztja, miszerint OVX patkányokban 20 perccel exogén E2 adást követően mechanikai hiperalgézia kialakulása figyelhető meg (An és mtsai., 2014). Kimutatták, hogy az E2 szint szabályozza a GPER1 expresszióját, és patkányok szenzoros neuronjaiban ovariektomizálás után csökkent expresszióját figyelték meg, amit E2 visszajuttatásával helyreállítottak (Takanami és mtsai., 2010).

Az E2 által kiváltott GPER1 aktiváció szenzoros neuronokban gyors, perceken vagy akár másodperceken belüli intracelluláris cAMP és Ca²⁺-szint növekedést eredményez (Craft, 2007; Mannino és mtsai., 2007; Dennis és mtsai., 2009; Hucho és mtsai., 2006, 2007; Kuhn és mtsai., 2008), az intracelluláris Ca²⁺-szint növekedés pedig stimulálja a PKCε-t és fájdalomérzetet vált ki (Goswami és mtsai., 2004, 2007). PKCε-on keresztüli foszforiláció célpontja a TRPV1 Cterminálisán megtalálható szerin 800 régió. Goswami és munkatársai a TRPV1 receptor Cterminálisát jelölik meg, mint az ösztrogén és a PKCε jelátviteli eszközét, amely a mikrotubulus-stabilitást és a mikrotubulus függő fájdalomérzékelést szabályozza (Goswami és mtsai., 2011). Beszámoltak arról is korábbi közleményekben, hogy az E2 kiváltotta nociceptor excitabilitás és TRPV1 szenzitizáció a szenzoros neuronokban hasonló az NGF TrkA receptoron keresztüli hatásához (Flake ésmtsai., 2005; Diogenes és mtsai., 2006). Az NGF olyan jelátviteli utat aktivál, melyben a foszfoinozitol-3-kináz az Src kinázzal együtt foszforilálja a TRPV1 receptort. Az NGF gyors hatását a TRPV1 receptorokon leginkább a tirozin származék foszforilációja magyarázhatja.

Az NGF másik fontos hatása, hogy elősegíti a TRPV1 receptor transzlokációját a sejtfelszíni membránon. Tíz perces NGF kezelés 1,6-szorosára növeli a membránban megtalálható TRPV1 expresszióját, TrkA és TRPV1-el transzfektált HEK293 sejtekben (Zhang és mtsai., 2005).

64

Azon eredményünk, hogy a TrkA gátló alkalmazása eltörölte az E2-indukált TRPV1 szenzitizációt szenzoros neuron tenyészetben azt bizonyítja, hogy NGF-szerű mechanizmus játszik közre az E2 hatásmechanizmusában. Ez valószínűleg magyarázatot szolgáltat a magasabb fájdalomérzékenységre a nőknél, és összefüggésben van az E2-indukálta fokozott TRPV1 aktiváció molekuláris mechanizmusával az érző neuronokban. Ezek a mechanizmusok nem csak az elsődleges szenzoros neuronokon és azok perifériás végződésein mennek végbe, hanem a központi idegrendszer nem neuronális sejtjeiben is. Szinoviociták primer tenyészetében szintén kimutatták, hogy az E2 és az NGF TRPV1 expresszió növekedést eredményez, és a NGF antitestek teljesen blokkolják az E2-kiváltotta TRPV1 expresszió emelkedést (Jezierski és mtsai., 2001).

A hippokampusz kiemelt szerepet játszik a nemek közti különbségekben a fájdalomérzékelés tekintetében. A hippokampális NGF, akárcsak a szinoviális NGF és a TRPV1, emelkedett expressziót mutatott patkányoknál temporomandibuláris gyulladásban, amit az E2 tovább potencírozott. A centrális NGF és a TrkA jelátviteli útvonal blokkolása részben visszafordítja a temporomandibuláris ízület (TMJ) gyulladását (Wu és mtsai., 2010). Ezért az E2 mediálta TRPV1 szenzitizáció mellett egy NGF-mediált mechanizmus is valószínűsíthető. Az ösztrogén növeli a TMJ afferensek ingerlékenységét, és fokozza a szenzoros neuronok gyulladás-okozta érzékenységét (Flake és mtsai., 2005). Saját eredményink is alátámasztják a TRPV1 receptor szerepét a gyulladásos érzékenység-fokozódások hátterében. Ezért feltételezzük, hogy szelektív ösztrogén receptor modulátorokkal blokkolva az ösztrogén hatását a szenzoros neuronokon olyan analgetikus hatást érhetünk el, amely főként a nőknél előforduló krónikus fájdalomállapotokban megfelelő fájdalomcsillapító hatással bírna.

VIII.2.2. Klinikai jelentőség

A kísérletes eredmények mellett a klinikai tanulmányok is egyértelműen leírják, hogy a nők számos krónikus fájdalomállapotban érzékenyebbek a férfiaknál (Ruau és mtsai., 2012). Legtöbb adatot arra vonatkozóan találni, hogy a nők menopauza során nagyobb érzékenységet mutatnak, és gyakrabban alakul ki náluk krónikus fájdalomállapot (Hurley és mtsai., 2008; Fillingim és mtsai., 2009; Berkley és mtsai., 1997; Von Korff és mtsai., 1988, 1998; Riley és mtsai., 1998). Általában a nőknél nagyobb a prevalenciája a muszkuloszkeletális rendszer degeneratív megbetegedésének, ami súlyos fájdalommal jár, akárcsak a diszkopátia és a lumbágó. Azonban az is ismert, hogy a menopauzán átesett nők fájdalomérzete magasabb csökkent ösztrogén szint mellett is (Ganderton és mtsai., 2016; Wáng és mtsai., 2016), ami ellentmond az E2 által indukált fájdalomérzékenységnek. Az könnyen belátható, hogy a csontokban és a muszkuloszkeletális rendszerben, valamint a jelentősebb posztmenopauzális degeneratív folyamatok során az E2 által kiváltott védő hatás hiánya miatt figyelhető meg intenzívebb fájdalomérzés.

Mivel számos befolyásoló tényezőt (genetikai és epigenetikai háttér, pszichológia, testmozgás, oktatás, geográfia, stb.) figyelembe vevő tanulmányok sem voltak alkalmasak az ösztrogén fájdalommoduláló hatásának pontos leírására (Kozinoga és mtsai., 2015; Frange és mtsai., 2016), kiterjedt klinikai vizsgálatokra lenne szükség a mechanizmusok feltárásához.

Cikkünk az első átfogó megközelítés arra vonatkozóan, hogy *in vivo* és *in vitro* bizonyítékot szolgáltasson az E2-indukálta TRPV1 receptor expresszió növekedésére és szenzitizációjára, mind a klasszikus genomiális, mind a gyors, nem-genomiális ösztrogén hatás révén, amelyet a TrkA jelátviteli útvonal közvetít. Az E2-indukálta TRPV1 szenzitizáció és a szenzoros neuronokban leírt megnövekedett expresszió magyarázhatja a nők nagyobb fájdalomérzékenységét.

IX. Új eredmények összefoglalása

- Bizonyítottuk, hogy az SSAO gátló vegyületünk, az SZV-1287 koncentráció– függő módon és szignifikánsan csökkenti a TRPV1 és TRPA1 receptorok aktivációját szenzoros neuronokon, perifériás érzőideg-végződéseken pedig a TRPA1 receptort aktivációját gátolja. *In vitro* kísérleteink alapjául szolgálnak az SZV-1287 mint fájdalomcsillapító gyógyszerjelölt preklinikai dossziéjának összeállításához, mely egy GINOP pályázat keretei között zajlik.
- Az SZV-1287-től eltérő szerkezetű, de szintén SSAO gátló vegyület, az LJP 1207 nem volt hatással a TRPA1 és TRPV1 receptorok aktivációjára egyik kísérleti modellben sem, így az SZV-1287 ezen receptorokon való gátló hatása független az SSAO gátló tulajdonságától.
- 3. In vivo állatkísérletes modellekben bizonyítottuk, hogy a nőstény egerek mechano- és termonociceptív küszöbértéke az ösztrusz ciklus proösztrusz fázisában - mikor legmagasabb az ösztrogénszint – jelentősen alacsonyabb, a hímek és ösztrusz fázisban lévő nőstények fájdalomküszöb értékeinél. Elsőként írtuk le, hogy TRPV1 génhiányos nőstények és a hímek hőmérsékleti fájdalomküszöb értékei között nem mutatkozott különbség.
- 4. Szintén állatkísérletekkel bizonyítottuk, hogy ovariektomizált egerek esetében exogén E2 hatására a mechanikai hiperalgézia fokozódik.
 - 5. In vitro intracelluláris kalciummérés vizsgálatainkkal, valamint kvantitatív PCR vizsgálatokkal alátámasztottuk, hogy az E2 fokozza a TRPV1 receptor aktivációját, valamint E2 kezelés hatására megnövekszik a TRPV1 expressziója. Bizonyítottuk továbbá, hogy képes a TRPV1 receptor deszenzitizációjának megszüntetésére, és bizonyítékot szolgáltattunk a mechanizmusra is, mely TrkA receptor mediálta jelátviteli úton keresztül történik. Bizonyítottuk tehát, hogy az E2-indukálta TRPV1 receptor expresszió növekedése és szenzitizációja mind a klasszikus genomiális, mind a gyors, nem-genomiális ösztrogén hatás révén létrejön.

X. Irodalmi hivatkozások

Aalto K, Maksimow M, Juonala M, Viikari J, Jula A, és mtsai. Soluble vascular adhesion protein-1 correlates with cardiovascular risk factors and early atherosclerotic manifestations. Arterioscler Throm Vasc Biol 2012; 32:523-32.

Abraham IM, Han SK, Todman MG, Korach KS, Herbison AE. Estrogen receptor beta mediates rapid estrogen actions on gonadotropin-releasing hormone neurons in vivo. J Neurosci 2003; 23(13):5771-7.

Airas L, Mikkola J, Vainio JM, Elovaara I, Smith DJ. Elevated serum soluble vascular adhesion protein-1 (VAP-1) in patients with active relapsing remitting multiple sclerosis. J Neuroimmunol 2006;177:132-5.

Akopian AN, Ruparel NB, Jeske NA, Hargreaves KM. Transient receptor potential TRPA1 channel desensitization in sensory neurons is agonist dependent and regulated by TRPV1-directed internalization. J Physiol 2007; 583:175-93.

Almulki L, Noda K, Nakao S, Hisatomi T, Thomas KL, Hafezi-Moghadam A. Localization of vascular adhesion protein-1 (VAP-1) in the human eye. Exp Eye Res. 2010 Jan;90(1):26-32. doi: 10.1016/j.exer.2009.09.005.

An G, Li W, Yan T, Li S. Estrogen rapidly enhances incisional pain of ovariectomized rats primarily through the G protein-coupled estrogen receptor. Int J Mol Sci 2014; 15(6):10479-91. doi: 10.3390/ijms150610479.

Andersson DA, Gentry C, Moss S, Bevan S. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. J Neurosci 2008; 28:2485–2494.

Andrés N, Lizcano JM, Rodríguez MJ, Romera M, Unzeta M, Mahy N. Tissue activity and cellular localization of human semicarbazide-sensitive amine oxidase. J Histochem Cytochem 2001; 49:209-17.

Autio A, Vainio PJ, Suilamo S, Mali A, Vainio J, Saanijoki T, Noponen T, Ahtinen H, Luoto P, Teräs M, Jalkanen S, Roivainen A. Preclinical evaluation of a radioiodinated fully human antibody for in vivo imaging of vascular adhesion protein-1-positive vasculature in inflammation. J Nucl Med. 2013;54(8):1315-9. doi: 10.2967/jnumed.113.120295.

Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. Neuron 2004; 41(6): 849-57.

Baraldi PG, 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 2010; 53(14):5085-107.

Barrière DA, Rieusset J, Chanteranne D, Busserolles J, Chauvin MA, Chapuis L Salles J, Dubray C, Morio B. Paclitaxel therapy potentiates cold hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic rats through enhanced mitochondrial reactive oxygen species production and TRPA1 sensitization. Pain 2012; 153(3):553-61.

Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Pamela R, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI, Julius D. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. Cell 2006;124:1269–82.

Bautista DM, Movahed P, Hinman A, Axelsson HE, Sterne O, Högestätt ED, Julius D, Jordt SE, Zygmunt PM. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102(34):12248-52.

Benemei S, De Cesaris F, Fusi C, Rossi E, Lupi C, Geppetti P. TRPA1 and other TRP channels in migraine. J Headache Pain 2013; 14:71.

Bereiter DA, Cioffi JL, Bereiter DF. Oestrogen receptor-immunoreactive neurons in the trigeminal sensory system of male and cycling female rats. Arch Oral Biol 2005; 50(11):971-9.

Berkley KJ. Sex differences in pain. Behav Brain Sci 1997; 20(3):371-80.

Bessac BF, Jordt SE. Breathtaking TRP channels: TRPA1 and TRPV1 in airway chemosensation and reflex control. Physiology (Bethesda). 2008; 23:360-70. doi: 10.1152/physiol.00026.2008.

Bevan S, Hothi S, Hughes G, James IF, Rang HP, Shah K, Walpole CS, Yeats JC. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. Br. J. Pharmacol. 1992; 107: 544-52.

Bevan S, Szolcsányi J. Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. Trends in Pharmacological Sciences 1990; 11: 330-333.

Bianchi BR, Lee CH, Jarvis MF, El Kouhen R, Moreland RB, Faltynek CR, Puttfarcken PS. Modulation of human TRPV1 receptor activity by extracellular protons and host cell expression system. Eur J Pharmacol 2006; 537:20–30.

Blair IA. Endogenous glutathione adducts. Curr Drug Metab. 2006; 7:853–872.

Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. Curr Opin Immunol 2000; 12:64-76.

Boomsma F, de Kam PJ, Tjeerdsma G, van den Meiracker AH, van Veldhuisen DJ. Plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) is an independent prognostic marker for mortality in chronic heart failure. Eur Heart J 2002; 21:1859-63.

Bölcskei K, Helyes Z, Szabó A, Sándor K, Elekes K, Németh J, Almási R, Pintér E, Petho G, Szolcsányi J. Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. Pain. 2005; 117(3):368-76.

Buffoni F and Ignesti G. The copper-containing amine oxidases: biochemical aspects and functional role. Mol Genet Metab 2000; 71:559–564.

Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA. Mouse estrous cycle identification tool and images. PLoS One 2012; 7(4):e35538. doi: 10.1371/journal.pone.0035538.

Caligioni CS. Assessing reproductive status/stages in mice. Curr Protoc Neurosci. 2009; Appendix 4:Appendix 4I. doi: 10.1002/0471142301.nsa04is48.

Cao E, Cordero-Morales JF, Liu B, Qin F, Julius D. TRPV1 channels are intrinsically heat sensitive and negatively regulated by phosphoinositide lipids. Neuron 2013; 77 (4):667–679.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channels in the pain pathway. Nature. 1997; 389: 816-824.

Cebi M, Koert U. Reactivity recognition by TRPA1 channels. Chembiochem 2007; 8(9):979-80.

Chen J. The evolutionary divergence of TRPA1 channel: heat-sensitive, cold-sensitive and temperature-insensitive. Temperature. 2015; 2: 158-159.

Chen SC, Chang TJ, Wu FS. Competitive inhibition of the capsaicin receptor-mediated current by dehydroepiandrosterone in rat dorsal root ganglion neurons. J Pharmacol Exp Ther 2004; 311:529–536.

Cho T, Chaban VV. Expression of P2X3 and TRPV1 receptors in primary sensory neurons from estrogen receptors- α and estrogen receptor- β knockout mice. Neuroreport 2012; 23(9):530-4. doi: 10.1097/WNR.0b013e328353fabc.

Choi S-I, Yoo S, Ji Lim Y, Hwang SW. Are Sensory TRP Channels Biological Alarms for Lipid Peroxidation? Int. J. Mol. Sci. 2014; 15(9), 16430-16457

Chu CJ, Huang SM, De Petrocellis L, Bisogno T, Ewing SA, Miller JD, Zipkin RE, Daddario N, Appendino G, Di Marzo V, Walker JM. N-oleoyl-dopamine, a novel endogenous capsaicinlike lipid that produces hyperalgesia. J. Biol. Chem. 2003; 278: 13633–13639.

Craft RM. Modulation of pain by estrogens. Pain 2007; 132 Suppl 1:S3-12.

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. 2007; 117: 1979–1987.

DeBerry JJ, Schwartz ES, Davis BM. TRPA1 mediates bladder hyperalgesia in a mouse model of cystitis. Pain. 2014; 155(7):1280-7.

DeFalco J, Steiger D, Gustafson A, Emerling DE, Kelly MG, Duncton MA. Oxime derivatives related to AP18: agonists and antagonists of the TRPA1 receptor. Bioorg Med Chem 2010; 20:276–279.

Dennis MK, Burai R, Ramesh C, Petrie WK, Alcon SN, Nayak TK, Bologa CG, Leitao A, Brailoiu E, Deliu E, Dun NJ, Sklar LA, Hathaway HJ, Arterburn JB, Oprea TI, Prossnitz ER. In vivo effects of a GPR30 antagonist. Nat Chem Biol 2009; 5(6):421-7. doi: 10.1038/nchembio.168.

Diogenes A, Patwardhan AM, Jeske NA, Ruparel NB, Goffin V, Akopian AN, Hargreaves KM. Prolactin modulates TRPV1 in female rat trigeminal sensory neurons. J Neurosci 2006; 26(31):8126-36.

Docherty RJ, Yeats JC, Bevan S, Boddeke HW. Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin-evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats. Pflugers Archiv European journal of physiology. 1996; 431: 828–837.

Dun SL, Brailoiu GC, Gao X, Brailoiu E, Arterburn JB, Prossnitz ER, Oprea TI, Dun NJ. Expression of estrogen receptor GPR30 in the rat spinal cord and in autonomic and sensory ganglia. J Neurosci Res 2009; 87:1610–1619.

Dunkel P, Gelain A, Barlocco D, Haider N, Gyires K, Sperlágh B, Magyar K, Maccioni E, Fadda A, Mátyus P. Semicarbazide-sensitive amine oxidase/vascular adhesion protein 1: recent developments concerning substrates and inhibitors of a promising therapeutic target. Curr Med Chem. 2008; 15(18):1827-39.

Eberhardt MJ, Filipovic MR, Leffler A, de la Roche J, Kistner K, Fischer MJ, Fleming T, Zimmermann K, Ivanovic-Burmazovic I, Nawroth PP, Bierhaus A, Reeh PW, Sauer S.K. Methylglyoxal activates nociceptors through transient receptor potential channel A1 (TRPA1): a possible mechanism of metabolic neuropathies. J. Biol. Chem. 2012; 287: 28291–28306.
Eid SR, Crown ED, Moore EL, Liang HA, Choong KC, Dima S, Henze DA, Kane SA, Urban MO. HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. Mol Pain. 2008; 4:48. doi: 10.1186/1744-8069-4-48.

El Hadri K, Moldes M, Mercier N, Andreani M, Pairsault J, Feve B. Semicarbazide-sensitive amine oxidase in vascular smooth muscle cells: differentiation-dependent expression and role in glucose uptake. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002;22:89-94.

Fernandes ES, Russell FA, Spina D, McDougall JJ, Graepel R, Gentry C, Staniland AA, Mountford DM, Keeble JE, Malcangio M, Bevan S, Brain SD. A distinct role for transient receptor potential ankyrin 1, in addition to transient receptor potential vanilloid 1, in tumor necrosis factor α -induced inflammatory hyperalgesia and Freund's complete adjuvant-induced monarthritis. Arthritis Rheum. 2011; (3):819-29. doi: 10.1002/art.30150.

Filip A, Pinzano A, Bianchi A, Feve B, Jalkanen S, és mtsai. Expression of the semicarbazidesensitive amine oxidase in articular cartilage: its role in terminal differentiation of chondrocytes in rat and human. Osteoarthritis Cartilage 2016;24:1223-34.

Fillingim RB, King CD, Ribeiro-Dasilva MC, Rahim-Williams B, Riley JL 3rd. Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings. J Pain 2009; 10(5):447-85. doi: 10.1016/j.jpain.2008.12.001.

Flake NM, Bonebreak DB, Gold MS. Estrogen and inflammation increase the excitability of rat temporomandibular joint afferent neurons. J Neurophysiol 2005; 93(3):1585-97.

Foot JS, Yow TT, Schilter H, Buson A, Deodhar M, Findlay AD, Guo L, McDonald IA, Turner CI, Zhou W, Jarolimek W. PXS-4681A, a potent and selective mechanism-based inhibitor of SSAO/VAP-1 with anti-inflammatory effects in vivo. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2013; 347 (2): 365–74.

Frange C, Hirotsu C, Hachul H, Pires JS, Bittencourt L, Tufik S, Andersen ML. Musculoskeletal pain and the reproductive life stage in women: is there a relationship? Climacteric 2016; 19(3):279-84. doi: 10.3109/13697137.2016.1163332.

Ganderton C, Semciw A, Cook J, Pizzari T. Does menopausal hormone therapy (MHT), exercise or a combination of both, improve pain and function in post menopausal women with greater trochanteric pain syndrome (GTPS)? A randomised controlled trial. BMC Womens Health 2016; 16(1):32. doi: 10.1186/s12905-016-0311-9.

Garpenstrand H, Ekbolom J, Bäcklund LB, Oreland L, Rosenqvist U. Elevated plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) activity in type 2 diabtes mellitus complicated by retinopathy. Diab Med 1999;16:514-21.

Garrison SR, Stucky CL. The dynamic TRPA1 channel: a suitable pharmacological pain target? Curr Pharm Biotechnol 2011; 12(10):1689-97.

Garrison SR, Stucky CL. Contribution of transient receptor potential ankyrin 1 to chronic pain in aged mice with complete Freund's adjuvant-induced arthritis. Arthritis Rheumatol 2014; 66(9):2380-90.

Gaudet R. TRP channels entering the structural era. J. Physiol. 2008; 586: 3565-3575.

Gavva NR. Body-temperature maintenance as the predominant function of the vanilloid receptor TRPV1. Trends Pharmacol Sci 2008; 29:550–557.

Gazerani P, Andersen OK, Arendt-Nielsen L. A human experimental capsaicin model for trigeminal sensitization. Gender-specific differences. Pain 2005; 118(12):155-63.

Geppetti P, Nassini R, Materazzi S, Benemei S. The concept of neurogenic inflammation. BJU Int.;101 Suppl 2008; 3:2-6. doi: 10.1111/j.1464-410X.2008.07493.x. Review.

Goswami C, Dreger M, Jahnel R, Bogen O, Gillen C, Hucho F. Identification and characterization of a Ca2+ -sensitive interaction of the vanilloid receptor TRPV1 with tubulin. J Neurochem 2004; 91:1092–1103.

Goswami C, Hucho T, Hucho F. Identification and characterisation of novel tubulin-binding motifs located within the C-terminus of TRPV1. J Neurochem 2007; 101: 250–262.

Goswami C, Kuhn J, Dina OA, Fernández-Ballester G, Levine JD, Ferrer-Montiel A, Hucho T. Oestrogen destabilizes microtubules through an ion-conductivity independent TRPV1 pathway. J of Neurochemistry 2011; 117(6):995-1008.

Grace MS, Baxter M, Dubuis E, Birrell MA, Belvisi MG. Transient receptor potential (TRP) channels in the airway: role in airway disease. Br J Pharmacol 2014; 171(10):2593-607.

Gunthorpe MJ, Benham CD, Randall A, Davis J.B. The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. Trends Pharmacol. Sci. 2002; 23:183-191.

Gunthorpe MJ, Chizh BA . Clinical development of TRPV1 antagonists: targeting a pivotal point in the pain pathway. Drug Discov Today 2009; 14(1-2):56-67.

Gyires K, Fürst Zs. A farmakológia alapjai 2011; Medicina Könyvkiadó Zrt.

Helyes Z, Mátyus P, Tékus V, Scheich B. Semicarbazide-sensitive amine-oxidase inhibitors, as analgesics in traumatic neuropathy and neurogenic inflammation. 2014; Hungarian and USA PCT P1400205.

Helyes Z, Németh J, Pintér E, Szolcsányi J. Inhibition by nociceptin of neurogenic inflammation and the release of SP and CGRP from sensory nerve terminals. Br J Pharmacol 1997; 121(4):613-5.

Helyes Z, Németh J, Thán M, Bölcskei K, Pintér E, Szolcsányi J. Inhibitory effect of anandamide on resiniferatoxin-induced sensory neuropeptide release in vivo and neuropathic hyperalgesia in the rat. Life Sci 2003; 73(18):2345-53.

Helyes Z, Pintér E, Németh J, Kéri G, Thán M, Oroszi G Horváth A, Szolcsányi J. Antiinflammatory effect of synthetic somatostatin analogues in the rat. Br J Pharmacol 2001; 134(7):1571-9.

Hernandez-Guillamon M, Solé M, Delgado P, García-Bonilla L, Giralt D, Boada C, Penalba A, García S, Flores A, Ribó M, Alvarez-Sabin J, Ortega-Aznar A, Unzeta M, Montaner J. VAP-1/SSAO plasma activity and brain expression in human hemorrhagic stroke. Cerebrovasc Dis. 2012; 33(1):55-63. doi: 10.1159/000333370.

Hiraoke A, Ohtaka J, Koike S, Tsuboi Y, Tsuchikawa S, Miura I. Inhibition of coppercontaining amine oxidase by oximes. Chem Pharm Bull (Tokyo) 1988;36:3027-31.

Holdcroft A, Berkley KJ. Sex and gender differences in pain and its relief. In SB McMahon, M Koltzenburg, PD Walk and R Melzaks eds. Walk and Melzak's textbook of pain. 5th ed. Edinburg: Elsevier Churchill Livingstone; 2006:1181-1197.

Holzer P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. Pharmacol Rev. 1991; 43(2):143-201.

Horváth Á, Menghis A, Botz B, Borbély É, Kemény Á, Tékus V, Csepregi JZ, Mócsai A, Juhász T, Zákány R, Bogdán D, Mátyus P, Keeble J, Pintér E, Helyes Z. Analgesic and Anti-Inflammatory Effects of the Novel Semicarbazide-Sensitive Amine-Oxidase Inhibitor SzV-1287 in Chronic Arthritis Models of the Mouse. Sci Rep. 2017; 7:39863. doi: 10.1038/srep39863.

Hőgyes A. Beitrage zur physiologischen Wirkung der Bestandsteile des Capsicum anuum. Exp. Panthol. Pharmacol. 1878; 9:117-130.

Hucho TB, Dina OA, Kuhn J, Levine JD. Estrogen controls PKCε dependent mechanical hyperalgesia through direct action on nociceptive neurons. Eur J Neurosci 2006; 24:527–534.

Hucho TB, Levine JD. Signaling pathways in sensitization: Toward a nociceptor cell biology. Neuron 2007; 55:365–376.

Hurley RW, Adams MC. Sex, gender, and pain: an overview of a complex field. Anesth Analg 2008; 107(1):309-17. doi: 10.1213/01.ane.0b013e31816ba437.

Inoue H, Asaka T, Nagata N, and Koshihara Y. Mechanism of mustard oil-induced skin inflammation in mice. Eur. J. Pharmacol., 1997; vol. 333, no. 2–3, pp. 231–240.

Jancsó N, Jancsó-Gábor A, Szolcsányi J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. Br. J. Pharmacol. 1967; 31: 138-151.

Jancsó N, Jancsó-Gábor A, Szolcsányi J. The role of sensory nerve endings in neurogenic inflammation induced in human skin and in the eye and paw of the rat. Br. J. Pharmacol. Chemother. 1968; 33: 32-41.

Jancsó N. Role of nerve terminals in the mechanism of inflammatory reactions. Bull. Millard. Fillmore. Hosp. Buffalo. NY. 1960; 7: 53-77.

Jarnicki AG, Schilter H, Liu G, Wheeldon K, Essilfie AT, Foot JS, Yow TT, Jarolimek W, Hansbro PM. The inhibitor of semicarbazide-sensitive amine oxidase, PXS-4728A, ameliorates key features of chronic obstructive pulmonary disease in a mouse model. Br J Pharmacol. 2016; 173(22):3161-3175. doi: 10.1111/bph.13573.

Jarolimek W, Charlton B. Phase 1 results from PXS-4728A, a selective SSAO/VAP-1 inhibitor, for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis. J Hepatol 2015; 62:S274-75.

Jezierski MK, Sturm AK, Scarborough MM, Sohrabji F. NGF stimulation increases JNK2 phosphorylation and reduces caspase-3 activity in the olfactory bulb of estrogen-replaced animals. Endocrinology 2001; 142(6):2401.

Johnston B, Kanwar S, Kubes P. Hydrogen peroxide induces leukocyte rolling: modulation by endogenous antioxidant mechanism including NO. Am J Physiol 1996; 271:H614-621.

Joó F, Szolcsányi J, Jancsó-Gábor A. Mitochondrial alterations in the spinal ganglion cells of the rat accompanying the long-lasting sensory disturbance induced by capsaicin. Life Sci. 1969; 8, 621-626.

Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Högestätt ED, Meng ID, Julius D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. Nature 2004; 427(6971):260-5.

Jordt SE, Julius D. Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. Cell. 2002; 108: 421-430.

Jordt SE, Tominaga M, Julius D. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000; 97: 8134-8139.

Kaitaniemi S, Elovaara H, Grön K, Kidron H, Liukkonen J, Salminen T, Salmi M, Jalkanen S, Elima K. The unique substrate specificity of human AOC2, a semicarbazide-sensitive amine oxidase. Cell Mol Life Sci. 2009; 66(16):2743-57. doi: 10.1007/s00018-009-0076-5.

Kaneko Y, Szallasi A Transient receptor potential(TRP) channels: a clinical perspective. Br J Pharmacol. 2014; 171(10):2474-507. doi: 10.1111/bph.12414.

Katagiri D, Hamasaki Y, Doi K, Negishi K, Sugaya T, Nangaku M, Noiri E.Interstitial renal fibrosis due to multiple cisplatin treatments is ameliorated by semicarbazide-sensitive amine oxidase inhibition. Kidney Int. 2016; 89(2):374-85.

Katsura H, Obata K, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, és mtsai. Antisense knock down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats. Exp Neurol 2006; 200:112-23.

Kimura H. Hydrogen sulfide and polysulfides as biological mediators. Molecules. 2014; 19:16146-16157

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 að/c-fibers and colocalization with trk receptors," J. Comp. Neurol., 2005; vol. 493, no. 4, pp. 596–606.

Koborová I, Gurecká R, Csongová M, Volkovová K, Szökő É, Tábi T, Šebekováűk K. Association between metabolically healthy central obesity in women and levels of soluble receptor for advanced glycation end products, soluble vascular adhesion protein-1, and activity of semicarbazide-sensitive amine oxidase. Croat Med J. 2017; 58(2): 106–116.

Kozinoga M, Majchrzycki M, Piotrowska S. Low back pain in women before and after menopause. Prz Menopauzalny 2015; 14(3):203-7. doi: 10.5114/pm.2015.54347.

Kuhn J, Dina OA, Goswami C, Suckow V, Levine JD, Hucho T. GPR30 estrogen receptor agonists induce mechanical hyperalgesia in the rat. Eur J Neurosci 2008; 27:1700–1709.

Kumar A, Bean LA, Rani A, Jackson T, Foster TC. Contribution of estrogen receptor subtypes, ER α , ER β , and GPER1 in rapid estradiol-mediated enhancement of hippocampal synaptic transmission in mice. Hippocampus 2015; 25(12):1556-66. doi: 10.1002/hipo.22475.

Kun J, Szitter I, Kemény A, Perkecz A, Kereskai L, Pohóczky K Vincze A, Gódi S, Szabó I, Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Z. Upregulation of the transient receptor potential ankyrin 1 ion channel in the inflamed human and mouse colon and its protective roles. PLoS One. 2014; 9(9):e108164. doi: 10.1371/journal.pone.0108164. eCollection 2014.

Kurkijärvi R, Adams, DH, Leino R, Möttönen T, Jalkanen S, Salmi M. Circulating form of human vascular adhesion protein-1 (VAP-1): increased serum levels in inflammatory liver diseases. J Immunol 1998; 161:1549-57.

Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, Christensen AP, Zhang DS, Woolf CJ, Corey DP. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. Neuron. 2006; 20;50(2):277-89

Lacroix-Fralish ML, Tawfik VL, Nutile-McMenemy N, DeLeo JA. Progesterone mediates gonadal hormone differences in tactile and thermal hypersensitivity following L5 nerve root ligation in female rats. Neuroscience 2006; 138(2):601-8.

Langford SD, Trent MB, Balakumaran A, Boor PJ. Developmental vasculotoxicity associated with inhibiton of semicarbazide-sensitive amine oxidase. Toxicol Appl Pharmacol 1999; 155:237-44.

Lee KI, Lee HT, Lin HC, Tsay HJ, Tsai FC, Shyue SK, Lee TS. Role of transient receptor potential ankyrin 1 channels in Alzheimer's disease. J Neuroinflammation. 2016; 13(1):92. doi: 10.1186/s12974-016-0557-z.

Li HY, Wei JN, Lin MS, Smith DJ, Vainio J, Lin CH, Chiang FT, Shih SR, Huang CH, Wu MY, Hsein YC, Chuang LM. "Serum vascular adhesion protein-1 is increased in acute and chronic hyperglycemia". Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry. 2009. 404 (2): 149–53.

Li YI, Hung JS, Yu TY, Liou JM, Wei JN, és mtsai. Serum vascular adhesion protein-1 predicts all-cause mortality and cancer-related mortality in subjects with colorectal cancer. Clin Chim Acta 2014;428:51-6.

Lieu T, Jayaweera G, Zhao P, Poole DP, Jensen D, Grace M McIntyre P, Bron R, Wilson YM, Krappitz M, Haerteis S, Korbmacher C, Steinhoff MS, Nassini R, Materazzi S, Geppetti P, Corvera CU, Bunnett NW. The bile acid receptor TGR5 activates the TRPA1 channel to induce itch in mice. Gastroenterology. 2014; 147(6):1417-28.

Lin MS, Li HY, Wei JN, Lin CH, Smith DJ, és mtsai. Serum vascular adhesion protein-1 is higher in subjects with early stages of chronic kidney disease. Clin Biochem 2008;41:1362-7.

Liu L, Simon SA. The influence of removing extracellular Ca2+ in the desensitization responses to capsaicin, zingerone and olvanil in rat trigeminal ganglion neurons. Brain Res. 1998; 809: 246-252.

Lu Y, Jiang Q, Yu L, Lu ZY, Meng SP, Su D, Burnstock G, Ma B. 17β estradiol rapidly attenuates P2X3 receptor-mediated peripheral pain signal transduction via ER α and GPR30. Endocrinology 2013; 154(7):2421-33. doi:10.1210/en.2012-2119.

Lu YC1, Chen CW, Wang SY, Wu FS. 17Beta-estradiol mediates the sex difference in capsaicin-induced nociception in rats. J Pharmacol Exp Ther. 2009; 331(3):1104-10. doi: 10.1124/jpet.109.158402.

Luo W, Xie F, Zhang Z, Sun D. Vascular adhesion protein 1 in the eye. J Ophtalmol 2013; 2013:925267.

Lyles GA. Mammalian Plasma and Tissue-Bound Semicarbazide Sensitive Amine Oxidase: Biochemical, Pharmacological and Toxicological Aspects. Int J Biochem Cell Biol 1996; 28:259-274.

Macpherson LJ, Dubin AE, Evans MJ, Marr F, Schultz PG, Cravatt BF, Patapoutian A. Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. Nature 2007; 445(7127):541-5.

Macpherson LJ, Geierstanger BH, Viswanath V, Bandell M, Eid SR, Hwang S, Patapoutian A. The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. Curr Biol 2005; 15(10):929-34.

Magyar K, Mészáros Z, Mátyus P. Semicarbazide-sensitive amine oxidase. Its physiological significance. Pure Appl Chem. 2001; 73(9):1393–400.

Mannino CA, South SM, Quinones-Jenab V, Inturrisi CE. Estradiol replacement in ovariectomized rats is antihyperalgesic in the formalin test. J Pain 2007; 8(4):334-42.

Martins SI, Madeira MD, Sá SI. Effects of gonadal steroids and of estrogen receptor agonists on the expression of estrogen receptor alpha in the medial preoptic nucleus of female rats. Neuroscience 2015; 10:63-72. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.09.030.

Marttila-Ichihara F, Smith DJ, Stolen C, Yegutkin GG, Elima K, és mtsai. Vascular amine oxidases are needed for leukocyte extravasation into inflamed joints in vivo. Arthritis Rheum 2006; 54:2852-62.

Mátyus P, Chai CL. Metabolism-Activated Multitargeting (MAMUT): An Innovative Multitargeting Approach to Drug Design and Development. ChemMedChem. 2016; 11(12):1197-8. doi: 10.1002/cmdc.201500406.

Mátyus P, Magyar K, Pihlavisto M, Gyires K, Haider N, és mtsai. Compounds for inhibiting semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO)/vascular adhesion protein-1 (VAP-1) and uses thereof for treatment and prevention of diseases. 2010;PCT Int Appl WO/2010/029379.

McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, Hayward NJ, Chong JA, Julius D, Moran MM, Fanger CM. TRPA1 mediates formalin-induced pain. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104(33):13525-30.

Messlinger K. Functional morphology of nociceptive and other fine sensory endings (free nerve endings) in different tissues. Prog Brain Res 1996; 113:273–298.

Mettus RV, Rane SG. Characterization of the abnormal pancreatic development, reduced growth and infertility in Cdk4 mutant mice. Oncogene. 2003; 22(52):8413-21.

Miller BH, Takahashi JS. Central circadian control of female reproductive function. Front Endocrinol (Lausanne). 2014; 4:195.

Mlícková K, Sebela M, Cibulka R, Frébort I, Pec P, és mtsai. Inhibition of copper amine oxidases by pyridine-derived aldoximes and ketoximes. Biochimie 2001;83:995-1002.

Moparthi L, Survery S, Kreir M, Simonsen C, Kjellbom P, Högestätt ED, Johanson U, Zygmunt PM. Human TRPA1 is intrinsically cold- and chemosensitive with and without its N-terminal ankyrin repeat domain. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014; 111(47):16901-6. doi: 10.1073/pnas.1412689111.

Myers BR, Bohlen CJ, Julius D. A yeast genetic screen reveals a critical role for the pore helix domain in TRP channel gating. Neuron 2008; 58(3):362-73. doi: 10.1016/j.neuron.2008.04.012.

Nagata K, Duggan A, Kumar G, Garcia-Anoveros J. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. J. Neurosci. 2005; 25: 4052–4061.

Nelson EK. The constitution of capsaicin, the pungent priciple of capsicum. J. Am. Chem. Soc. 1919; 41: 1115-1117.

Németh J, Helyes Z, Görcs T, Gardi J, Pintér E, Szolcsányi J. Development of somatostatin radioimmunoassay for the measurement of plasma and tissue contents of hormone. Acta Physiol. Hung. 1996; 84: 313-315.

Németh J, Görcs T, Helyes Z, Oroszi G, Kocsy T, Pintér E, Szolcsányi J. Development of a new sensitive CGRP radioimmunoassay for neuropharmacological research. Neurobiol (Bp) 1998; 6(4):473-5.

Nesuashvili L, Hadley SH, Bahia PK, Taylor-Clark TE. Sensory nerve terminal mitochondrial dysfunction activates airway sensory nerves via transient receptor potential (TRP) channels. Mol Pharmacol 2013; 83(5):1007-19.

Nilius B, Appendino G, Owsianik G. The transient receptor potential channel TRPA1: from gene to pathophysiology. Pflugers Arch. 2012; 464(5):425-58. doi: 10.1007/s00424-012-1158z. Epub 2012 Sep 22. Review.

Nilius B, Owsianik G. The transient receptor potential family of ion channels. Genome Biol. 2011; 12(3):218. doi: 10.1186/gb-2011-12-3-218.

Nilius B, Szallasi A. Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. Pharmacol Rev 2014; 66(3):676-814 doi: 10.1124/pr.113.008268.

Nilius B. TRP channels in disease. Biochim Biophys Acta. 2007; 1772(8):805-12.

Nilius B, Voets T, Peters J. TRP channels in disease. Sci STKE. 2005; (295):re8.

Numazaki M, Tominaga T, Takeuchi K, Murayama N, Toyooka H, Tominaga M. Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003; 100: 8002–8006.

O'Rourke AM, Wang EY, Miller A, Podar EM, Scheyhing K, Huang L, Kessler C, Gao H, Ton-Nu HT, Macdonald MT, Jones DS, Linnik MD. Anti-inflammatory effects of LJP 1586 [Z-3-fluoro-2-(4-methoxybenzyl)allylamine hydrochloride], an amine-based inhibitor of semicarbazide-sensitive amine oxidase activity. J Pharmacol Exp Ther. 2008 Feb; 324(2):867–75.

O'Sullivan J, Unzeta M, Healy J, O'Sullivan MI, Davey G, Tipton KF. Semicarbazide-sensitive amine oxidases: enzymes with quite a lot to do. Neurotoxicol 2004; 25(1-2):303-15.

Pannecoeck R, Serruys D, Benmeridja L, Delanghe JR, van Geel N, Speeckaert R, Speeckaert MM. Vascular adhesion protein-1: Role in human pathology and application as a biomarker. Crit Rev Clin Lab Sci. 2015; 52(6):284-300. doi: 10.3109/10408363.2015.1050714.

Papakosta M, Dalle C, Haythornthwaite A, Cao L, Stevens EB, Burgess G, Russell R, Cox PJ, Phillips SC, 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. 2011; 286: 39663-39672.

Papka RE, Storey-Workley M. Estrogen receptor-alpha and -beta coexist in a subpopulation of sensory neurons of female rat dorsal root ganglia. Neurosci Lett 2002; 319:71–74.

Patil MJ, Jeske NA, Akopian AN. TRPV1 regulates activation and modulation of TRPA1 by Ca2+. Neurosci 2010; 171(4):1109–1119.

Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B. TRP channels: An overview. Cell Calcium. 2005; 38: 233-252.

Perner RJ, Kort ME, Didomenico SJ, Chen J, Vasudevan A. (Heteroaryl)alkenone Oxime Derivatives as TRPA1 Antagonists Useful in the Treatment of Various Diseases. 2009; WO 2009089083.

Petrus M, Peier AM, Bandell M, Hwang SW, Huynh T, Olney N, Jegla T, Patapoutian A. A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. Mol Pain 2007; 3:40.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. Nucleic Acids Research 2001; 29(9):45.

Pogatzki-Zahn EM, Shimizu I, Caterina M, Raja SN. Heat hyperalgesia after incision requires TRPV1 and is distinct from pure inflammatory pain. Pain 2005; 115(3):296-307.

Pohóczky K, Kun J, Szalontai B, Szőke É, Sághy É, Payrits M, Kajtár B, Kovács K, Környei JL, Garai J, Garami A, Perkecz A, Czeglédi L, Helyes Z. Estrogen dependent up-regulation of TRPA1 and TRPV1 receptor proteins in the rat endometrium. J Mol Endocrinol 2016; 56(2):135-49. doi: 10.1530/JME-15-0184.

Pozsgai G, Payrits M, Sághy É, Sebestyén-Bátai R, Steen E, Szőke É, Sándor Z, Solymár M, Garami A, Orvos P, Tálosi L, Helyes Z, Pintér E. *Analgesic effect of dimethyl trisulfide in mice is mediated by TRPA1 and sst4 receptors*. Nitric Oxide. 2017; 65:10-21. doi: 10.1016/j.niox.2017.01.012.

Puri J, Bellinger LL, Kramer PR. Estrogen in cycling rats alters gene expression in the temporomandibular joint, trigeminal ganglia and trigeminal subnucleus caudalis/upper cervical cord junction. J Cell Physiol 2011; 226(12):3169-80. doi: 10.1002/jcp.22671.

Raisinghani M, Pabbidi RM, Premkumar LS. Activation of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) by resiniferatoxin. J Physiol 2005; 567:771–786.

Remadevi R, Szallisi A. Adlea (ALGRX-4975), an injectable capsaicin (TRPV1 receptor agonist) formulation for longlasting pain relief. IDrugs. 2008; 11(2):120-32.

Riley JL 3rd, Gilbert GH, Heft MW. Orofacial pain symptom prevalence: selective sex differences in the elderly? Pain 1998; 76(1-2):97-104.

Riley JL 3rd, Robinson ME, Wise EA, Myers CD, Fillingim RB. Sex differences in the perception of noxious experimental stimuli: a meta-analysis. Pain 1998; 74:181–187. doi: 10.1016/S0304-3959(97)00199-1

Riley JL 3rd, Robinson ME, Wise EA, Price DD. A meta-analytic review of pain perception across the menstrual cycle. Pain 1999; 81(3):225-35.

Ruau D, Liu LY, Clark JD, Angst MS, Butte AJ. Sex differences in reported pain across 11,000 patients captured in electronic medical records. J Pain 2012; 13(3):228-34. doi: 10.1016/j.jpain.2011.11.002.

Ryu H, Jin M, Kim SY, Choi H., Kang S, Kang DW, Lee J, Pearce LV, Pavlyukovets VA, Morgan A, Tran R, Toth A, Lundberg DJ, Blumberg PM. Stereospecific High-affinity TRPV1 Antagonists : 2- [4- (methylsulfonylamino) phenyl] propionamide Analogues. J. Med. Chem. 2008; 57–67.

Sághy É, Sipos É, Ács P, Bölcskei K, Pohóczky K, Kemény Á, Sándor Z, Szőke É, Sétáló G Jr, Komoly S, Pintér E. TRPA1 deficiency is protective in cuprizone-induced demyelination-A new target against oligodendrocyte apoptosis. Glia. 2016; 64(12):2166-2180. doi: 10.1002/glia.23051.

Sághy É, Szőke É, Payrits M, Helyes Z, Börzsei R, Erostyák J, Jánosi TZ, Sétáló G Jr., Szolcsányi J. 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. 2015; 100: 101-116.

Salas MM, Hargreaves KM, Akopian AN. TRPA1-mediated responses in trigeminal sensory neurons: interaction between TRPA1 and TRPV1. Eur J Neurosci 2009; 29(8):1568-78.

Sałat K, Jakubowska A, Kulig K. Zucapsaicin for the treatment of neuropathic pain. Expert Opin Investig Drugs. 2014; 23(10):1433-40. doi: 10.1517/13543784.2014.956079.

Salmi M, Jalkanen S. VAP-1: An adhesin and an enzyme. Trends Immunol 2001; 22:211-16.

Salmi M, Kalimo K, Jalkanen S. Induction and function of vascular adhesion protein-1 at sites of inflammation. J Exp Med 1993; 178(6):2255–2260.

Salter-Cid LM, Wang E, O'Rourke AM, Miller A, Gao H, Huang L, Garcia A, Linnik MD. Anti-inflammatory effects of inhibiting the amine oxidase activity of semicarbazide-sensitive amine oxidase. J Pharmacol Exp Ther 2005; 315(2):553-62.

Sándor Z, Varga A, Horváth P, Nagy B, Szolcsányi J. Construction of a stable cell line uniformly expressing the rat TRPV1 receptor. Cell. Mol. Biol. Lett. 2005; 10: 499-514.

Sawada Y, Hosokawa H, Matsumura K, Kobayashi S. Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by hydrogen peroxide. Eur J Neurosci 2008;27:1131-42.

Schnitzer TJ, Pelletier JP, Haselwood DM, Ellison WT, Ervin JE, Gordon RD, Lisse JR, Archambault WT, Sampson AR, Fezatte HB, Phillips SB, Bernstein JE. Civamide cream 0.075% in patients with osteoarthritis of the knee: a 12-week randomized controlled clinical trial with a longterm extension. J Rheumatol. 2012; 39(3):610-20. doi: 10.3899/jrheum.110192.

Smart D, Gunthorpe MJ, Jerman JC, Nasir S, Gray J, Muir AI, Chambers JK, Randall AD, Davis JB. The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). Br J Pharmacol 2000; 129:227–230.

Smith DJ, Salmi M, Bono P, Hellman J, Leu T, Jalkanen S. Cloning of vascular adhesion protein 1 reveals a novel multifunctional adhesion molecule. J Exp Med 1998; 188(1):17–27

Spath E, Darling SF. Synthesis of capsaicin. Ber. Chem. Ges. 1930; 65:737-740.

Stolen CM, Marttila-Ichihara F, Koskinen K, Yegutkin GG, Turja R, és mtsai. Absence of the endothelial oxidase AOC3 leads to abnormal leukocyte traffic in vivo. Immunity 2005; 22:105-15.

Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. Cell 2003; 112(6):819-29.

Szállási A, Blumberg PM. Specific binding of resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog, by dorsal root ganglion membranes. Brain. Res. 1990; 524: 106-111.

Szállási A, Blumberg PM. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. Pharmacol. Rev. 1999; 51: 159-212.

Szállási A, Cortright DN, Blum CA, Eid SR. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. Nat Rev Drug Discov 2007; 6(5):357-72.

Szolcsányi J. Neurogenic inflammation: reevaluation of axon reflex theory. In: P. Gepetti and P.Holzer (Eds.) Neurogenic Inflammation. CRC Press, Boka Raton, 1996; pp. 33-42.

Szolcsányi J., Jancsó-Gábor A. Sensory effects of capsaicin congeners I. Relationship between chemical structure and pain-producing potency of pungent agents. Arzneimittelforschung. 1975; 25: 1877-1881.

Szolcsányi J., Jancsó-Gábor A., Joó F. Functional and fine structural characteristics of the sensory neuron blocking effect of capsaicin. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 1975; 287: 157-69.

Szolcsányi J., Jancsó-Gábor A. Sensory effects of capsaicin congeners II: Importance of chemical structure and pungency in desensitizing activity of capsaicin-type compounds. Arzneimittelforschung. 1976; 26: 33-37.

Szolcsányi J. Hot target on nociceptors: perspectives, caveats and unique features. Br J Pharmacol 2008; 55 (8):1142–1144.

Szolcsányi J, Sándor Z. Multisteric TRPV1 nocisensor: a target for analgesics. Trends Pharmacol. Sci. 2012; 33: 646-55.

Szőke É, Balla Zs, Csernoch L, Czéh G, Szolcsányi J. Interacting effects ofcapsaicin and anandamide on intracellular calcium in sensory neurons. Neuroreport 2000; 11:1949–1952.

Szőke É, Börzsei R, Tóth DM, Lengl O, Helyes Z, Sándor Z, Szolcsányi J. Effect of lipid raft disruption on TRPV1 receptor activation of trigeminal sensory neurons and transfected cell line. Eur J Pharmacol 2010; 628(1-3):67-74.

Tábi T, Szökő E, Mérey A, Tóth V, Mátyus P, Gyires K. Study on SSAO enzyme activity and anti-inflammatory effect of SSAO inhibitors in animal model of inflammation. J Neural Transm (Vienna). 2013; 120(6):963-7. doi: 10.1007/s00702-012-0961-1.

Takanami K, Sakamoto H, Matsuda K, Hosokawa K, Nishi M, Prossnitz ER, Kawata M. Expression of G protein-coupled receptor 30 in the spinal somatosensory system. Brain Res 2010; 1310:17-28. doi: 10.1016/j.brainres.2009.11.004.

Talavera K, Gees M, Karashima Y, Meseguer VM, Vanoirbeek JAJ, Damann N, Everaerts W, Benoit M, Janssens A, Vennekens R, Viana F, Nemery B, Nilius B. Nicotine activates the chemosensory cation channel TRPA1. Nat Neurosci, 2009; vol. 12, no. 10, pp. 1293–1299.

Taylor-Clark TE, McAlexander MA, Nassenstein C, Sheardown SA, Wilson S, Thornton J, Carr MJ, Undem BJ. Relative contributions of TRPA1 and TRPV1 channels in the activation of vagal bronchopulmonary C-fibres by the endogenous autacoid 4-oxononenal. J. Physiol. 2008; 586: 3447–3459.

Thresh LT. Isolation of capsaicin. Pharm. J. 1846; 6:941-947.

Treen AK, Luo V, Chalmers JA, Dalvi PS, Tran D, Ye W, Kim GL, Friedman Z, Belsham DD. Divergent Regulation of ER and Kiss Genes by 17β -Estradiol in Hypothalamic ARC Versus AVPV Models. Mol Endocrinol 2016; 30(2):217-33. doi: 10.1210/me.2015-1189.

Trevisani M, Siemens J, Materazzi S, Bautista DM, Nassini R, Campi B Imamachi N, Andrè E, Patacchini R, Cottrell GS, Gatti R, Basbaum AI, Bunnett NW, Julius D, Geppetti P. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104(33):13519-24.

Trivedi PJ, Tickle J, Vesterhus MN, Eddowes PJ, Bruns T, Vainio J, Parker R, Smith D, Liaskou E, Thorbjørnsen LW, Hirschfield GM, Auvinen K, Hubscher SG, Salmi M, Adams DH, Weston CJ. Vascular adhesion protein-1 is elevated in primary sclerosing cholangitis, is predictive of clinical outcome and facilitates recruitment of gut-tropic lymphocytes to liver in a substrate-dependent manner. Gut. 2017 Apr 20. pii: gutjnl-2016-312354. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312354.

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. 1998; 21: 531-543.

Ufret-Vincenty CA, Klein RM, Hua L, Angueyra J, Gordon SE. Localization of the PIP2 sensor of TRPV1 ion channels. J. Biol. Chem. 2011; 286: 9688–9698.

Unzeta M, Solé M, Boada M, Hernández M. Semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) and its possible contribution to vascular damage in Alzheimer's disease. J Neural Transm (Vienna). 2007; 114(6):857-62.

Valente T, Gella A, Solé M, Durany N, Unzeta M. Immunohistochemical study of semicarbazide-sensitive amine oxidase/vascular adhesion protein-1 in the hippocampal vasculature: pathological synergy of Alzheimer's disease and diabetes mellitus. J Neurosci Res. 2012; 90(10):1989-96. doi: 10.1002/jnr.23092.

Vander Jagt DL. Methylglyoxal, diabetes mellitus and diabetic complications. Drug Metabol Drug Interact 2008; 23(1-2):93-124.

Vizi ES. Humán farmakológia - A racionális gyógyszerterápia alapjai 2002; Medicina Könyvkiadó Rt.

Von Korff M, Dworkin SF, Le Resche L, Kruger A. An epidemiologic comparison of pain complaints. Pain 1988; 32(2):173-83.

Von Korff MR, Howard JA, Truelove EL, Sommers E, Wagner EH, Dworkin S. Temporomandibular disorders. Variation in clinical practice. Med Care 1998; 26(3):307-14.

Walker KM, Urban L, Medhurst SJ, Patel S, Panesar M, Fox AJ, McIntyre P. The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2003; 304, 56–62.

Wallace M, Pappagallo M. Qutenza®: a capsaicin 8% patch for the management of postherpetic neuralgia. Expert Rev Neurother. 2011; 11(1):15-27. doi: 10.1586/ern.10.182.

Walton AP, Wei GT, Liang Z, Michel RG, Morris JB. Laser-excited atomic fluorescence in a flame as a high-sensitivity detector for organomanganese and organotin compounds following separation by high-performance liquid chromatography. Anal Chem. 1991; 63(3):232-40.

Wang EY, Gao H, Salter-Cid L, Zhang J, Huang L, Podar EM Miller A, Zhao J, O'rourke A, Linnik MD. Design, synthesis, and biological evaluation of semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) inhibitors with anti-inflammatory activity. J Med Chem 2006; 49(7):2166-73.

Wang S, Dai Y, Fukuoka T, Yamanaka H, Kobayashi K, Obata K, Cui X, Tominaga M, Noguchi K. Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. Brain 2008; 131:1241–1251.

Wáng YX, Wáng JQ, Káplár Z. Increased low back pain prevalence in females than in males after menopause age: evidences based on synthetic literature review. Quant Imaging Med Surg 2016; 6(2):199-206. doi: 10.21037/qims.2016.04.06.

Welch JM, Simon SA, Reinhart PH. The activation mechanism of rat vanilloid receptor 1 by capsaicin involves the pore domain and differs from the activation by either acid or heat. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97:13889–13894.

Wood JN, Winter J, James IF, Rang HP, Yeats J, Bevan S. Capsaicin- induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. J. Neurosci. 1988; 8: 3208-3220.

Wu YW, Bi YP, Kou XX, Xu W, Ma LQ, Wang KW, Gan YH, Ma XC. 17-Beta-estradiol enhanced allodynia of inflammatory temporomandibular joint through upregulation of hippocampal TRPV1 in ovariectomized rats. J Neurosci 2010; 30(26):8710-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6323-09.2010.

Wu YW, Hao T, Kou XX, Gan YH, Ma XC. Synovial TRPV1 is upregulated by 17-β-estradiol and involved in allodynia of inflamed temporomandibular joints in female rats. Arch Oral Biol 2015; 60(9):1310-8. doi:10.1016/j.archoralbio.2015.05.011.

Yang J, Li Y, Zuo X, Zhen Y, Yu Y, Gao L. Transient receptor potential ankyrin-1 participates in visceral hyperalgesia following experimental colitis. Neurosci Lett 2008; 440(3):237-41.

Yoshikawa N, Noda K, Shinoda H, Uchida A, Ozawa Y, Tsubota K, Mashima Y, Ishida S. Serum vascular adhesion protein-1 correlates with vascular endothelial growth factor in patients with type II diabetes. J Diabetes Complications. 2013; 27(2):162-6. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2012.09.001.

Yu PH, Shannon W, Fan EH, Lun ZR, Gubisne-Harberle D. Physiological and pathological implications of semicarbazide-sensitive amine oxidase. Biochim Biophys Acta 2003; 1647:193-9.

Zhang X, Huang J, McNaughton PA. NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. The EMBO Journal 2005; 24:4211–4223.

Zurborg S, Yurgionas B, Jira JA, Caspani O, and Heppenstall PA. Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca2+, Nat Neurosci, 2007; vol. 10, no. 3, pp. 277–279.

Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sørgård M, Di Marzo V, Julius D, Högestätt ED. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. Nature. 1999; 400: 452–457.

https://www.acorda.com/products/research-development/btt1023

https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02239211

http://www.pharmaxis.com.au/product-pipeline/amine-oxidase-platform/ssao-inhibitor pxs4728a/

XI. Az értekezés alapját képező publikációk

Payrits M, Sághy É, Mátyus P, Czompa A, Ludmerczki R, Deme R, Sándor Z, Helyes Z, Szőke
É. (2016). A novel 3-(4,5-diphenyl-1,3-oxazol-2-yl) propanal oxime compound is a potent
Transient Receptor Potential Ankyrin 1 and Vanilloid 1 (TRPA1 and V1) receptor antagonist.
Neuroscience. 324:151-162. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.02.049.
IF: 3,277

Payrits M, Sághy É, Szolcsányi J, Pohóczky K, Csekő K, Bölcskei K, Barabás K, Ernszt D, Ábrahám I, Helyes Z, Szőke É. (2017). *Estradiol sensitises the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 channel in pain responses*. Endocrinology. 158(10):3249-3258. doi.org/10.1210/en.2017-00101.
IF: 4,286

Összesített impact faktor: **7,563** Összes független citáció: 2

XII. Egyéb eredeti publikációk

Sághy É, Szőke É, **Payrits M,** Helyes Z, Börzsei R, Erostyák J, Jánosi TZ, Sétáló G. Jr., Szolcsányi J. (2015). *Evidence for the role of lipid rafts and sphingomyelin in Ca*²⁺-gating of Transient Receptor Potential channels in trigeminal sensory neurons and peripheral nerve terminals. Pharmacol. Res. 100: 101-116. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.08.043. IF: 4,816

Sághy É, **Payrits M,** Helyes Z, Reglődi D, Bánki E, Tóth G, Couvineau A, Szőke É. (2015). *Stimulatory effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 6-38, M65 and vasoactive intestinal polypeptide 6-28 on trigeminal sensory neurons.* Neuroscience. 308: 144-156.

IF: 3,357

Pohóczky K, Kun J, Szalontai B, Szőke É, Sághy É, **Payrits M,** Kajtár B, Kovács K, Környei JL, Garai J, Garami A, Perkecz A, Czeglédi L, Helyes Z. (2016). *Estrogen-dependent upregulation of TRPA1 and TRPV1 receptor proteins in the rat endometrium.* J. Mol. Endocrinol. 56: 135-149. doi: 10.1530/JME-15-0184. IF: 3,993

Hajna Z, Sághy É, **Payrits M,** Aubdool AA, Szőke É, Pozsgai G, Bátai IZ, Nagy L, Filotás D, Helyes Z, Brain SD, Pintér E. (2016). *Capsaicin-sensitive sensory nerves mediate the cellular and microvascular effects of H*₂*S via TRPA1 receptor activation and neuropeptide release*. Journal of Molecular Neuroscience. 60(2):157-70. doi: 10.1007/s12031-016-0802-z. IF: 2,229

Pozsgai G, **Payrits M**, Sághy É, Sebestyén-Bátai R, Steen E, Szőke É, Sándor Z, Solymár M, Garami A, Orvos P, Tálosi L, Helyes Z, Pintér E. (2017). *Analgesic effect of dimethyl trisulfide in mice is mediated by TRPA1 and sst4 receptors*. Nitric Oxide. 65:10-21. doi: 10.1016/j.niox.2017.01.012. IF:4,181

Összesített impact faktor: 18,576

Összes független citáció: 18

XIII. Idézhető absztraktok

Szőke É., Sághy É., **Payrits M.,** Mátyus P., Deme R., Helyes Zs. (2014). A semicarbazidesensitive amine oxidase (SSAO) inhibitor has an antagonistic action on TRP ion channels on primary sensory neurons. Digestive diseases and sciences. 59(8): 1664-1665.

Sághy É., **Payrits M.,** Szőke É., Pozsgai G., Pintér E. (2014). Activation of TRPA1 ion channel by hydrogen sulfide and polysulfides in trigeminal sensory neurons. J. Mol. Neurosci. 53(1):138-183.

Szőke É., Sághy É., **Payrits M.,** Mátyus P., Deme R., Helyes Zs. (2014). Dual antagonistic action of a semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) inhibitor on TRP ion channels on primary sensory neurons and sensory nerve terminals. J. Mol. Neurosci. 53(1) :138-183.

Szőke É., **Payrits M.**, Sághy É., Mátyus P., Czompa A., Ludmerczki R., Deme R., Helyes Zs. (2015). A novel 3-(4,5-diphenyl-1,3-oxazol-2-yl) propanal oxime compound is a potent transient receptor potential ankyrin 1 and vanilloid 1 antagonist. Journal of Neurochemistry. 134(1):127.

Sághy É., **Payrits M.**, Szőke É., Pozsgai G., Pintér E. (2015). Analgesic effect of polysulfide compound dimethyl trisulfide in mild heat injury-iduced mechanical hyperalgesia in mice is mediated hyperalgesia in mice by TRPA1 and sst4 receptors. Nitric Oxide. 47: 51-52.

Sághy É., **Payrits M.,** Szőke É., Pozsgai G., Pintér E. (2015). TRPA1 receptor-activating effect of hydrogen sulfide and polysulfides in sensory neurons. Nitric Oxide. 47: 51.

Pinter E, Bolcskei K, Saghy E, **Payrits M**, Kriszta G, Vranesics A, Sipos E, Acs P, Berente Z, Abraham H, Komoly S. (2017). TRPA1 receptor deficiency substantially diminishes the cuprizone-induced demyelination. JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY 142:(1) pp. 171-172. ISN-ESN Meeting. Paris, Franciaország: 2017.08.20 -2017.08.24.

XIV. Kongresszusi poszter prezentációk

M. Payrits, É. Szőke, É. Sághy, T. Bagoly, Zs. Helyes, J. Szolcsányi: *Effect of resolvin D1 and resolvin D2 on TRP ion channel activation*. International Brain Research Organization Workshop, Debrecen, Hungary 2014. P12, 33.

É. Sághy¹, **M. Payrits¹**, É. Szőke¹, T. Bagoly¹, P. Mátyus², R. Deme², Zs. Helyes¹: *Role of semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) inhibitors on TRP ion channel activation.* International Brain Research Organization Workshop, Debrecen, Hungary 2014. P14, 35.

Sághy É., **Payrits M**., Szőke É., Bagoly T., Mátyus P., Deme R., Helyes Zs. *Antagonistic action of a semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) inhibitor on TRP ion channels.* A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság Experimentális Farmakológiai szekciójának VIII. szimpoziuma és az MBKE Gyógyszerbiokémiai Szakosztály XXVIII. Munkaértekezlete, Velence, Magyarország, 2014.

Payrits M., Sághy É., Szőke É., Bagoly T., Helyes Zs., Szolcsányi J. *Inhibition of transient receptor potential ion channels by resolvins*. A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság Experimentális Farmakológiai szekciójának VIII. szimpoziuma és az MBKE Gyógyszerbiokémiai Szakosztály XXVIII. Mukaértekezlete, Velence, Magyarország, 2014.

Sághy É., **Payrits M.**, Szőke É., Bagoly T., Mátyus P., Deme R., Helyes Zs.: *A szemikarbazid-szenzitív aminoxidáz (SSAO) gátlók hatása a TRP ioncsatornák aktivációjára.* Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XV., Budapest, Magyarország, 2014.

M. Payrits, É. Szőke, É. Sághy, T. Bagoly, Zs. Helyes, J. Szolcsányi: *Inhibition of transient receptor potential ion channels by endogenous lipid mediators*. Joint Meeting of the Federation of European Physiological Societies (FEPS) and Hungarian Physiological Society, Budapest, 2014.

Sághy É., **Payrits M**., Szőke É., Bagoly T., Mátyus P., Deme R., Helyes Zs.: *New semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) inhibitor as a dual antagonist of TRPA1 and TRPV1 ion channels*. Joint Meeting of the Federation of European Physiological Societies (FEPS) and the Hungarian Physiological Society, Budapest, 2014.

Pozsgai Gábor, Sághy Éva, **Payrits Maja**, Szőke Éva, Elise Steen, Helyes Zsuzsanna, Pintér Erika: *A poliszulfid dimetil-triszulfid analgetikus hatását a TRPA1 receptor*. Joint Meeting of the Federation of European Physiological Societies (FEPS) and Hungarian Physiological Society, Budapest, 2014.

Szoke E, Saghy E, **Payrits M**, Banki E, Reglodi D, Toth G, Couvineau A, Helyes Zs: *Effect* of Pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide and its analogues on the specific PAC1 and VPAC1/VPAC2 receptors on the cell bodies of primary sensory neurons and transfected cell lines. World Congress of Pharmacology, Cape Town, South Africa. 2014.

Pintér E., Hajna Zs., Sághy É., **Payrits M.**, Szőke É., Pozsgai G., Helyes Zs.: *Pharmacological characterization of TRPA1 receptormediated microvascular changes induced by hydrogen sulfide in the mouse ear.* XVII. World Congress of Pharmacology, Cape Town, Dél-Afrika, 2014.

É. Sághy¹, **M. Payrits¹**, É. Szőke¹, G. Pozsgai¹, E. Pintér¹: *Activation of TRPA1 ion channel* by hydrogen sulfide and polysulfides in trigeminal sensory neurons. 20th International Symposium on Regulatory Peptides in Kyoto, Japan, 2014.

É. Szőke, É. Sághy, **M. Payrits**, P. Mátyus, R. Deme, Zs. Helyes: *Dual antagonistic action os a semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) inhibitor on TRP ion channels on primery sensory neurons and sensory nerve terminals*. 20th International Symposium on Regulatory Peptides held at 6-9 September 2014 in Kyoto, Japan.

Payrits M., Sághy É., Szőke É., Bagoly T., Helyes Zs., Szolcsányi J. *Tranziens Receptor Potenciál ioncsatornák gátlása resolvinnal.* A Magyarországi Fájdalomtársaság Kongresszusa és a IV. Neurostimulációs Szimpózium a Magyar Neurológiai Társaság Részvételével, Pécs, Magyarország, 2014.

Sághy É., **Payrits M.,** Szőke É., Bagoly T., Mátyus P., Deme R., Helyes Zs. *A szemikarbazid-szenzitív aminoxidáz gátlók hatása a TRP ioncsatornák aktivációjára*. A Magyarországi Fájdalomtársaság 2014. évi Kongresszusa és a IV. Neurostimulációs Szimpózium a Magyar Neurológiai Társaság Részvételével, Pécs, Magyarország, 2014.

Gábor Pozsgai, Éva Sághy, **Maja Payrits**, Éva Szőke, Elise Steen, Zsuzsanna Helyes, Erika Pintér: *Analgesic Effect of Polysulfide Compound Dimethyl Trisulfide Is Mediated via TRPA1 Receptors*. Pharmacology 2015., England, London, 2015.

Erika Pintér, Zsófia Hajna, Gábor Pozsgai, Éva Sághy, **Maja Payrits**, Éva Szőke, Zsuzsanna Helyes, János Szolcsányi: *Characterization of transient receptor potential ankyrin1 (TRPA1) receptor-mediated cellular and microvascular changes induced by hydrogen sulphide*. Pharmacology 2015., England, London, 2015.

Éva Sághy, Gábor Pozsgai, **Maja Payrits**, Éva Szőke, Erika Pintér: *TRPA1 receptor*activating effect of hydrogen sulfide and polysulfides in sensory neurons. 2015. 3rd European Conference ont he Biology of Hydrogen Sulfide, 2015. May 3-6. Görögország, Athén Éva Sághy, **Maja Payrits**, Éva Szőke, Gábor Pozsgai, Erika Pintér: Analgesic effect of polysulfude compound dimethyl trisulfide in mild heat injury-induced mechanical hyperalgesia in mice is mediated by TRPA1 and SST4 receptors. 3rd European Conference ont he Biology of Hydrogen Sulfide, 2015. May 3-6. Görögország, Athén

Payrits M., Sághy É., Bagoly T., Szolcsányi J., Helyes Zs., Mátyus P., Deme R., Szőke É.: *Egy új SSAO gátló vegyület hatása a Tranziens Receptor Potenciál ioncsatornák aktivációjára.* Idegtudományi Centrum/Szentágothai János Kutatóközpont PhD és TDK konferencia, Pécs. előadás

M. Payrits, É. Sághy, P. Mátyus, A. Czompa, R. Ludmerczki, R. Deme, Zs. Helyes, É. Szőke: Egy *új oxim vegyület antagonista hatásának jellemzése Tranziens Receptor Potenciál ioncsatornákon*. A Magyar Kísérlete és Klinikai Farmakológiai Társaság Experimentális Farmakológiai szekciójának IX. szimpóziuma, Velence. P-013, 20.

É. Sághy, **M. Payrits**, É. Szőke, G. Pozsgai, E. Pintér: *Hidrogén-szulfid donor vegyületek és poliszulfidok Tranziens Receptor Potenciál Ankirin 1 (TRPA1) receptorok aktiváló hatása*. A Magyar Kísérlete és Klinikai Farmakológiai Társaság Experimentális Farmakológiai szekciójának IX. szimpóziuma, Velence. (2. helyezés) P-014, 20.

Szőke Éva, Sághy Éva, **Payrits Maja**, Helyes Zsuzsanna, Börzsei Rita, Szolcsányi János: *A szfingomielináz alkalmazása Tranziens Receptor Potenciál ioncsatornák vizsgálatában.* A Magyar Kísérlete és Klinikai Farmakológiai Társaság Experimentális Farmakológiai szekciójának IX. szimpóziuma, Velence. P-018, 21.

Pohóczky Krisztina, Szalontai Bálint, Bohonyi Noémi, Kercsmár Anita, Szőke Éva, **Payrits Maja**, Perkecz Anikó, Garai János, Garami András, Kovács Krisztina, Környei József, Koppán Miklós, Helyes Zsuzsanna: *Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1 és Ankirin 1 (TRPV1 és TRPA1) ioncsatornák jelenléte és ösztrogénfüggő expresszió-növekedése patkány és emberi endometriumban.* A Magyar Kísérlete és Klinikai Farmakológiai Társaság Experimentális Farmakológiai szekciójának IX. szimpóziuma, Velence. P-015, 20.

M. Payrits, É. Sághy, P. Mátyus, A. Czompa, R. Ludmerczki, R. Deme, Zs. Helyes, É. Szőke. *Egy új Tranziens Receptor Potenciál ioncsatorna antagonista vegyület farmakológiai jellemzése szenzoros neuronokon*. Élettani Társaság 79. Vándogyűlése, Szeged, 2015.

Szőke Éva, Sághy Éva, **Payrits Maja**, Helyes Zsuzsanna, Börzsei Rita, Szolcsányi János. *A szfingomielináz alkalmazása Tranziens Receptor Potenciál ioncsatornák vizsgálatában.* Magyar Élettani Társaság 79. Vándogyűlése, Szeged, 2015.

Pohóczky Krisztina, Szalontai Bálint, Kun József, Bohonyi Noémi, Kercsmár Anita, Szőke Éva, Sághy Éva, **Payrits Maja**, Perkecz Anikó, Garai János, Garami András, Kovács Krisztina, Kajtár Béla, Környei József, Koppán Miklós, Helyes Zsuzsanna. A Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1 és Ankyrin 1 (TRPV1 és TRPA1) ioncsatornák jelenléte és ösztrogén kezelés hatására bekövetkező expresszió-növekedése patkány és emberi endometriumban. Magyar Élettani Társaság 79. Vándogyűlése, Szeged, 2015.

M. Payrits, É. Szőke, Zs. Helyes, I.M. Ábrahám, E. Pintér: *The role of Transient Receptor Potential Ankyrin1 receptors in* β *-amyloid*₁₋₄₂ *-induced cholinergic neurodegeneration in the basal forebrain.* Neuropeptides 2015. Skócia, Aberdeen. P12.

Éva Szoke, Éva Sághy, **Maja Payrits**, Zsuzsanna Helyes, János Erostyák, Tibor Jánosi, György Sétáló. *Evidence for the role of sphingomyelin and lipid rafts in Ca2+-gating of the Transient Receptor Potential channels in trigeminal sensory neurons and peripheral nerve terminals*. Neuropeptides Skócia, Aberdeen. 2015.

Krisztina Pohóczky, József Kun, Bálint Szalontai, Éva Szőke, Éva Sághy, **Maja Payrits**, Anikó Perkecz, József Környei, János Garai, András Garamia, Krisztina Kovács, Béla Kajtár, Levente Czeglédi, Zsuzsanna Helyes. *Transient Receptor Potential Ankyrin1* (*TRPA1*) and vanilloid 1 (*TRPV1*) ion channels are expressed and upregulated in response to estrogen in the rat endometrium. Neuropeptides Skócia, Aberdeen. 2015.

M. Payrits, É. Szőke, Zs. Helyes, I.M. Ábrahám, E. Pintér: *The role of Transient Receptor Potential Ankyrin1 receptor in* β *-amyloid*₁₋₄₂*-induced Alzheimer's disease*. IBRO, Budapest. P2/54.

Payrits M., Sághy É., Szolcsányi J., Pohóczky K., Csekő K., Bölcskei K., Ernszt D., Barabás K., Ábrahám I., Helyes Zs., <u>Szőke É.</u> Evidence for the role of eastradiol on gating on the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 channels in trigeminal sensory neurons and in in vivo animal models. IBRO Workshop, Budapest, Magyarország, 2016.

Payrits Maja, Borbély Éva, Szőke Éva, Helyes Zsuzsanna, Ábrahám M. István, Pintér Erika: *A Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1 receptor szerepe β-amyloid1-42-indukált kolinerg sejtpusztulásban in vivo*. FAMÉ2016, Pécs P3.107

Szőke É., **Payrits M.,** Sághy É., Bíró-Sütő T., Pohóczky K., Csekő K., Bölcskei K., Ernszt D., Barabás K., Ábrahám I., Szolcsányi J., Helyes Zs. *Az ösztradiol szerepe Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1 ioncsatin aktivációjában szenzoros neuronokon és in vivo állatkísérletekben*. FAMÉ2016, Pécs, Magyarország 2016. Pécs P2.66

Pozsgai Gábor, Bátai István Z., **Payrits Maja**, Sághy Éva, Sebestyén-Bátai Réka, Elise Steen, Szőke Éva, Sándor Zoltán, Solymár Margit, Garami András, Orvos Péter, Tálosi László, Helyes Zsuzsanna, Pintér Erika: *Dialkil-poliszulfidok hatása a nocicepció és gyulladás egérmodelljeiben* FAMÉ2016, Pécs előadás

Pintér Erika, Sághy Éva, **Payrits Maja**, Bölcskei Kata, Perkecz Anikó, Sándor Zoltán, Kemény Ágnes, Szőke Éva, Ács Péter, Sipos Éva, Komoly Sámuel, Helyes Zsuzsanna, Ábrahám István: *A Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1 (TRPA1) receptor szerepe a neurodegeneratív kórképekben*. FAMÉ2016, Pécs előadás

Payrits M, Borbély É, Szőke É, Helyes Z, Ábrahám I and Pintér E: *The role of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 receptor in* β *-amyloid1-42-induced Alzheimer's disease*. RegPep2016, Rouen, Franciaország 2016.

Szőke É, **Payrits M**, Sághy É, Szolcsányi J, Csekő K, Pohóczky K, Bölcskei K, Ernszt D, Barabás K, Ábrahám I and Helyes ZS: *Effect of estradiol on gating of the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 channels in sensory neurons and in in vivo animal models*. RegPep2016, Rouen, Franciaország 2016.

Payrits Maja, Borbély Éva, Szőke Éva, Helyes Zsuzsanna, Ábrahám M. István, Pintér Erika: *A Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1 és Vanilloid 1 receptor szerepe demenciában*. MFT Gyógyszerinnovációs Kongresszusa. Velence 2017.

Bölcskei Kata, Sághy É., Sipos É., Kriszta G., **Payrits M**., Pohóczky K., Vranesics A., Berente Z., Ifj, Sétáló Gy., Ábrahám H., Komoly S., Pintér E. *A TRPA1 receptor hiánya védő hatású a cuprizin-indukált demielinizáció egérmodelljében*. MFT Gyógyszerinnovációs Kongresszusa. Velence 2017.

Szőke Éva, Sághy É., **Payrits M.,** Bíró-Sütő T., Skodáné Földesi R., Szánti-Pintér E., Makkai G., Erostyák J., Ifj. Sétáló Gy., Helyes Zs. *Karboxamino-szteroid vegyületek TRP ioncsatorna gátló hatásának vizsgálata a lipid raftok modulálásán keresztül.* MFT Gyógyszerinnovációs Kongresszusa. Velence 2017.

Bölcskei K, Sághy É, Sipos É, Kriszta G, **Payrits M**, Pohóczky K, Vranesics A, Berente Z, Sétáló Gy Jr., Ábrahám H, Ács P, Komoly A, Pintér E. *Role of the TRPA1 receptor int he cuprizone-induced experimental demyelination model*. FENS Regional Meeting took place in Pécs, Hungary, 20–23. September 2017. előadás

Kun J, Aczél T, Szőke É, **Payrits M**, Bölcskei E, Helyes Zs. *Expression and inflammationinduced up-regulation of hemokinin-1 in the trigeminal system, and its effect on cultured trigeminal ganglion neurons*. FENS Regional Meeting, Pécs, Hungary, 20–23. September 2017.

Payrits M, Borbély É, Szőke É, Helyes Zs, Barabás K, Ábrahám IM, Pintér E. *The role of Transinet Receptor Potential Ankyrin1 Receptor in B-amyloid1-42-induced Alzheimer's disease*. FENS Regional Meeting, Pécs, Hungary, 20–23. September 2017.

Szőke É, Sághy É, **Payrits M**, Bíró-Sütő T, Skodáné Földes R, Szánti-Pintér E, Erostyák J, Makkai G, Sétáló Jr Gy, Szolcsányi J, Helyes Zs. *N*-(*pro-2-ynyl*)-*carboxamido sterouds*

inhibit the oprning properties of TRP ion channels by modulation of lipid rafts. FENS Regional Meeting, Pécs, Hungary, 20–23. September 2017.

Payrits Maja, Éva Sághy, Kata Csekő, Krisztina Pohóczky, Kata Bölcskei, Dávid Ernszt, Klaudia Barabás, János Szolcsányi, István Ábrahám, Zsuzsanna Helyes, Éva Szőke. *Estradiol sensitises the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 channel in pain responses.* 13th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides. Hong Kong, Kína 2017. előadás

E. Pinter, **M. Payrits**, É. Borbély, K. Barabás, I. Ábraham, I. Udvarácz, É. Szőke, Zs. Helyes. *TRPA1 receptor can be a promising drug target in neurodegeneretive disorders*. 13th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides. Hong Kong, Kína 2017. előadás

J. Kun, T. Aczél, É. Szőke, **M. Payrits**, K. Bölcskei, Z. Helyes. *Hemokinin-1 activates cultered trigeminal neurons and its Tac4 mRNA is upregulated in a rat orofacial pain model.* 13th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides. Hong Kong, Kína 2017. előadás

Éva Szőke, Éva Sághy, **Maja Payrits**, Zsuzsanna Helyes, Rita Skodáné Földes, Eszter Szánti-Pintér, Tünde Bíró-Sütő, János Erostyák, Géza Makkai, György Sétáló Jr, László Kollár, Tamás Kőszegi, János Szolcsányi. *Carboxamido steroids inhibit the opening properties of Transient Receptor Potential Ion Channel by modulation of lipid rafts*. 13th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides. Hong Kong, Kína 2017.

XV. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Szőke Évának a PhD-s éveim során nyújtott rengeteg segítségét, iránymutatását és bíztató szavait. Köszönöm, hogy mindig fordulhatok hozzá kérdéseimmel, mindig értékes szakmai tanácsokkal lát el és hogy az élet minden területén számíthatok a segítségére. Köszönettel tartozom az intézetünk és a doktori iskola vezetőjének, Prof. Dr. Pintér Erikának, aki kutatómunkámat lehetővé tette és kutatásaim során mindig támogatott, végtelen kitartásával pedig követendő példát mutatott. Köszönettet szeretnék mondani Prof. Dr. Helyes Zsuzsannának a támogatásáért, magas szintű szakmai tanácsaiért, és azért a lelkesedésért, melyet a kutatói szakma iránt mutat. Köszönet doktori iskolánk megalapítójának Szolcsányi János Professzor Úrnak, aki példát mutat mindannyiunk számára szakmai elhivatottságával. Köszönettel tartozom Prof. Dr. Ábrahám Istvánnak az idegtudományok és az agykutatás módszertanának megismerésében nyújtott segítségéért.

Köszönöm Dr. Sághy Éva és Dr. Borbély Éva segítségét a kísérletes módszerek elsajátításában, precizitásuk példa értékű volt számomra. Köszönöm PhD hallgató társaimnak, Dr. Csekő Katának, Pohóczky Krisztinának, Bencze Noéminek, Dr. Aczél Tímeának, Dr. Horváth Ádámnak, Dr. Hunyady Ágnesnek, Bátai Zoárdnak és Biró-Sütő Tündének, hogy szakmai tanácsért mindig bizalommal fordulhatok hozzájuk, és hogy jelenlétükkel és barátságukkal a mindennapi munkámat vidámmá és még élvezetesebbé teszik. Köszönöm Dr. Barabás Klaudiának a kísérleteim folyamán nyújtott segítségét. Köszönetet szeretnék mondani Dr. Bölcskei Katának, Dr. Pozsgai Gábornak, Dr. Kemény Ágnesnek, Dr. Tékus Valériának, Dr. Kecskés Angélának, akik szakmai tanácsaikkal segítették a munkámat. Köszönet Dr. Sándor Zoltánnak a TRPV1 és TRPA1 receptor-expresszáló sejtvonal létrehozásáért.

Hálás vagyok a kísérletekben nyújtott nélkülözhetetlen segítségért Disztl Cecíliának, Ömböli Gyuláné Dórinak, Bagoly Teréznek, Sabáliné Udvarácz Ildikónak, Búzási Ádámné Annának, Szentes Nikolettnek, Hírné Perkecz Anikónak, Zöldhegyi Józsefné Marának, Harsányi Zsófiának és Draskóczi Lillának, akik kitűnő asszisztensi munkájukkal járultak hozzá a kísérleteim sikerességéhez. Köszönetet szeretnék mondani a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet valamennyi dolgozójának a munkám során nyújtott segítségükért, és a pozitív munkahelyi légkörért, ami megkönnyítette feladataim elvégzését. Köszönettel tartozom kollaborációs partnerünknek Dr. Mátyus Péternek és munkatársainak az SSAO-gátló vegyületek szintetizálásáért és a szakmai vezetőmunkáért. A PhD munkámhoz nyújtott támogatásért köszönettel tartozom a Richter Gedeon Talentum Alapítványnak.

Végül szeretném megköszönni családomnak és férjemnek azt a rengeteg támogatást, ami lehetővé tette, hogy ez a dolgozat megszülessen.