

Egyetemi doktori (Ph.D) értekezés tézisei

A TRPV1 KAPSZAICIN RECEPTOR FARMAKOLÓGIAI VIZSGÁLATA

Varga Angelika

Neurofarmakológiai Program

Programvezető: Dr. Szolcsányi János, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Czéh Gábor és

Dr. Sándor Zoltán

Pécsi Tudományegyetem

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

MTA Neurofarmakológiai Kutatócsoport, Pécs

2006

ELMÉLETI HÁTTÉR, ELŐZMÉNYEK

A Pécsi Tudományegyetem Farmakológiai és Farmakoterápiái Intézetében Dr. Szolcsányi János akadémikus munkásságának köszönhetően a kapszaicinnal (a paprika csípőanyaga, N-vanillil-8-metil-6-nonamid) foglalkozó kutatások nagy múltra tekintenek vissza. A kapszaicin írott emlékek alapján legalább 500 éve használatos a népi gyógyászatban ízületi megbetegedésekben illetve fájdalomcsillapításra.

A „*kétélű kard*”-ként emlegetett kapszaicin (és analógjai) a kapszaicin-szenzitív primer afferens neuronokon azonnali excitátoros (égető fájdalom), nagyobb koncentrációban alkalmazva deszenzitizáló (analgetikus), illetve irreverzibilis neurotoxikus hatást fejtenek ki (Szolcsányi 1993, 2002, 2005; Sándor & Szállási, 2005).

A deszenzitizáció világszerte intenzív kutatások tárgya a szenzoros neuronokra szelektíven ható fájdalomcsillapító illetve gyulladáscsökkentő gyógyszerek kifejlesztése céljából. A deszenzitizáció fogalmát kétféle értelemben szokás használni. Egyiknél a receptormolekula agonista iránti érzékenysége csökken (*farmakológiai* deszenzitizáció), a másiknál pedig a TRPV1 receptort hordozó idegvégződés lesz természetes ingereire érzéketlen (*szenzoros vagy funkcionális* deszenzitizáció). A funkcionális változásokat morfológiai tünetek kísérhetik, az enyhe mitokondriális duzzadástól a neurondegenerációig.

Az eredetileg VR1-nek keresztelt kapszaicin-érzékeny molekula (vanilloid receptor 1-es típus; Caterina és mtsai, 1997) egy ligandfüggő, nem szelektív kalciumcsatorna ($P_{Ca}:P_{Na}=9:1$), melynek direkt aktivátorai a különböző vanilloid származékok, a fájdalmas hőinger (Szállási & Blumberg, 1999) és az extracelluláris pH savas irányba történő eltolódása (Tominaga és mtsai, 1998). A legújabb IUPHAR (International Union of Pharmacology) nomenklatúra szerint a kapszaicin receptorát TRPV1 névvel illetik (transient receptor potential vanilloid 1-es típus; Clapham és mtsai, 2003).

A TRPV1 receptor 9 évvel ezelőtti klónozása valódi tudományos áttörésnek bizonyult (Caterina és mtsai, 1997) és egyhamar a nemzetközi kutatások élvonalába került. Innentől sorra klónozzák meg a különböző emlősfajok, a humán (Hayes és mtsai, 2000), a tengeri malac (Savidge és mtsai, 2002), a nyúl (Gavva és mtsai, 2004), az egér (Correll és mtsai, 2004), valamint a kutya (Phelps és mtsai, 2005) TRPV1 receptor ortológjait.

A TRPV1 receptor olyan polimodális integratív funkciójú membránprotein, melynek feladata a fájdalmas termikus és kémiai stimulusok detektálása polimodális nociceptorokban (Caterina és mtsai, 2000), másrészt szerepe van a gyulladás által kiváltott termális hiperalgéziában (Davis és mtsai, 2000). A hipotalamusz preoptikus areájában található

TRPV1 receptorok a hőszabályozás termodetektorai (Jancsó-Gábor és mtsai, 1970; Szolcsányi és mtsai, 1971).

Az extracelluláris proton koncentrációjának növekedése a hőaktivált áramokat is erősíti (Tominaga és mtsai, 1998). A fiziológias pH 6,4-re illetve 5,9-re csökkentése a TRPV1 receptor hőküszöbét 43°C-ról 37°C-ra illetve 22°C-ra módosítja. A TRPV1 csatorna hőküszöbe fiziológias körülmények között 42-43°C, azonban gyulladáskor, szöveti sérüléskor szintetizálódó és/vagy liberalizálódó endogén proinflammatorikus peptidok, bioaktív anyagok különböző érzékenyítő mechanizmusok bevonásával (protein kináz stimulálás, foszfatidil-inozitol-trifoszfát (PIP₂) hidrolízis, TRPV1-kalmodulin interakció gátlás) csökkentik a TRPV1 csatorna hőküszöbét. A PIP₂ hidrolízise felszabadítja a TRPV1 receptort a PIP₂-mediált gátlás alól (Chuang és mtsai, 2001; Liu és mtsai, 2005; Prescott & Julius, 2003). A bradikinin (BK) és az idegnövekedési faktor (NGF) szenzitizáló hatása részben ilyen módon érvényesül.

Mivel a TRPV1 génhiányos egerekben a normális mechanikai érzékenység mellett a termális érzékenység is megmaradt, gyaníthatóvá vált más hőmérsékleti tartományokban érzékeny hőszenzorok létezése (Caterina és mtsai, 2000; Davis és mtsai, 2000). A TRPV alcsalád jelenleg ismert hat tagja közül négy (TRPV1-4) hőre is érzékeny kationcsatorna. A robbanásszerű fejlődést mi sem bizonyítja jobban, hogy már az egyes TRP molekulák közötti filogenetikai kapcsolatokat is feltérképezték, melyek változatos funkciókat töltenek be a *Caenorhabditis elegans*tól a *Homo sapiens*ig. Ma már a TRP receptorcsalád mintegy 30 tagja ismeretes.

CÉLKITŰZÉS ÉS TEMATIKAI FELOSZTÁS

Az értekezésben bemutatott munka fő célja a TRPV1 receptorok által közvetített intracelluláris kalciumkoncentráció növekedéssel járó különböző szabályozó mechanizmusok mélyebb feltárása és a TRPV1 csatornafehérje farmakológiai tanulmányozása egyrészt újszülött patkányok trigeminális neurontenyészetén, másrészt patkány TRPV1 receptorral transzfektált HT1080-as fibroszarkóma sejteken, valamint különböző *in vivo* állatmodellekben.

Munkám 5 fő téma köré csoportosítható:

I. Az új TRPV1 receptor antagonistá SB366791 hatásainak *in vitro* és *in vivo* farmakológiai vizsgálata

II. Az N-oleoildopamin és analógjainak *in vitro* hatáselemzése

III. A protein kináz A és C relatív szerepének vizsgálata a TRPV1 receptor érzékenységének modulálásában

IV. A TRPV1 receptor-mediált intracelluláris kalciumionszint emelkedés vizsgálata extracelluláris kalcium hiányában

V. A TRPV1 kapszaicin receptor aktiválás és a mitokondrium funkció vizsgálata

MÓDSZERTAN

Sejttípusok

Patkány trigeminális ganglionsejt tenyészet (TRG) készítését Szőke és mtsai leírása alapján (2000) végeztük.

A patkány TRPV1 receptort stabilan expresszáló HT5-1 sejtvonal (rTRPV1-HT5-1) HT1080 humán fibroszarkóma sejtvonalból származott (Sándor és mtsai, 2005).

Mikrofluorimetriás technikák

Intracelluláris kalciumionszint-mérés fluoreszcens módszerrel

A sejteket 1 μM fura-2-acetoxy-metilészter (fura-2; 1 μM) fluoreszcens, kalciumindikátor festéket tartalmazó oldatban inkubáltuk. A méréseket szobahőmérsékleten elsötétített helyiségben végeztük Olympus BX50WI epifluoreszcens mikroszkóppal. A fluoreszcens képet egy 20 \times -os nagyítású vízimmerziós objektív és egy számítógéphez csatlakoztatott digitális kamera segítségével rögzítettük. A sejteket alternálva 340 és 380 hullámhosszú fényel világítottuk meg egy monokromátor segítségével. A két hullámhosszon gerjesztett fluoreszcencia intenzitás arányát (raciometrius érték, $R=F_{340}/F_{380}$) az idő függvényében az Axon Imaging Workbench 2.1 szoftverrel regisztráltuk, a kapott függvényeket a Microcal Origin 7.0 program segítségével értékeltük.

A relatív intracelluláris szabad kalciumionszint és a mitokondriális membránpotenciál változás szimultán mérése

Ennek a technikának a bevezetése, helyi viszonyainkra történő adaptálása saját feladatom volt. A sejteket a fura-2 (1 μM) és a pozitív töltésű rhodamin 123-mal (rhod-123; 26 μM) egyidőben festettük meg 30 percig, 37°C-on. A két festéket felváltva gerjesztettük és az emittált fény intenzitását a szokásos módon videokamerával és számítógéppel rögzítettük.

A lipofil kationfesték rhod-123 pozitív töltései révén a negatív membránpotenciálú mitokondriumban kioltott fluoreszcenciával akkumulálódik, majd egy depolarizáló impulzus

alkalmával a festék reverzibilisen, a mitokondriális membránpotenciál változását követve kikerül a citoszolba. A rhod-123 citoplazmába történő kiszabadulása (fluoreszcencia intenzitásának emelkedése) a mitokondrium belső membránjának depolarizációját jelzi (Emaus és mtsai, 1986; White & Reynolds, 1995).

A Kalciumizotóppal ($^{45}\text{Ca}^{2+}$)-végzett kísérletek kivitelezését Wood és munkatársai 1988-as publikációja alapján végeztük és mindössze 2 éve vezettük be intézetünk *in vitro* metodikáinak fegyvertárába. A 72-lyukú mini tenyésztőedényben a tenyésztett rTRPV1-HT5-1 sejteket a TRPV1 receptor agonista és 200 $\mu\text{Ci/ml}$ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ izotóp elegyével inkubáltuk. A minta radioaktivitását 2 ml szcintillációs folyadékban Packard Tri-Carb 2800-as TR számlálóval mértük.

P-anyag felszabadulásának vizsgálata *in vitro* tracheapreparátumon

Patkányok tracheáit kimetszettük és szervfürdőnként 2-2 tracheát 37°C-os oxigenizált Krebs oldattal 1 órán át perfundáltuk. Az átáramlás leállítását után a kamrákban lévő oldatot 8 percenként lecserélve három frakciót gyűjtöttünk (ingerlés előtti – ingerelt – ingerlés utáni). A peptidfelszabadulást kapszaicinnel (10^{-6} M) vagy elektromos téringerléssel (40 V, 0,1 ms, 10 Hz, 2 perc; 1200 impulzus) váltottuk ki a második 8 perces periódus kezdetén. A TRPV1 antagonistá SB366791-et minden nyolc perces periódus elején adtuk az inkubációs médiumhoz. A kontroll kísérletekben az ingerlést az antagonistá hiányában végeztük. Az egyes frakciók P-anyag koncentrációit intézetünkben Németh József és kollégái által kifejlesztett specifikus RIA módszer segítségével határoztuk meg (1999).

***In vivo* kísérletek**

Az SB366791 hatása a kapszaicinnel kiváltott térdízületi vérátáramlás-fokozódásra

Az uretános altatásban a kapszaicin (100 $\mu\text{g/kg}$, 100 μl) térdízületre történő lokális alkalmazását követően 35 percen át 5 percenként monitoroztuk a szinoviális véráramlást lézer Doppler áramlásmérő műszerrel (kontroll csoport). Az állatok másik csoportja 20 perccel a kapszaicin adása előtt intraperitoneális (i.p.) SB366791 vagy kapszazepin (CZP) előkezelésben részesült.

Az SB366791 hatása a kapszaicinnel kiváltott testhőmérséklet csökkenésre

A kapszaicin (300 µg/kg, s.c.) okozta hipotermiát rektális hőméréssel 10 percenként, összesen 6 alkalommal mértük ♂ Wistar patkányokban valamint Balb/c egerekben. Az állatok másik csoportját 20, 60 illetve 120 perccel a kapszaicin adása előtt i.p. előkezeltük az SB366791 vagy a CZP megfelelő oldatával.

Kapszaicinnel kiváltott szemtörlési reflex vizsgálata

A bal szembe történő kapszaicin cseppentést (10 µg/ml, 50 µl) követően 3 percen keresztül számoltuk a mellső lábakkal végzett törlő mozdulatokat (Szolcsányi és mtsai, 1975). Az i.p. SB366791 vagy a CZP előkezelés a kapszaicin cseppentés előtt 20, 60 vagy 120 perccel korábban történt.

Nociceptív hőküszöb mérése emelkedő hőmérsékletű forró lap módszerrel

Az Almási és kollégái (2003) által kidolgozott ún. „*hot plate*” módszer lényege, hogy a számítógép-vezérelt fémlap hőmérsékletét 30°C-ról egyenletes ütemben (12°C/perc) emeltük mindaddig, amíg az állat (♀ Wistar patkány) fájdalomra utaló magatartását nem tapasztaltuk (lábemelés ill. nyalás). A különböző protein kináz inhibitorok hatásának tesztelésére az RTX nagyobb (0,5 µM, 100 µl), míg a protein kináz aktivátorok szerepének tanulmányozására az RTX tízszer alacsonyabb dózisát választottuk (0,05 µM, 100 µl). Az RTX beadása előtt az állatok egyik csoportját 5 percre intraplantárisan előkezeltük a PKC vagy PKA a modulátorral, míg a másik csoport az enzimmodulátor szolvensét kapta.

I. AZ ÚJ TRPV1 RECEPTOR ANTAGONISTA SB366791 HATÁSAINAK *IN VITRO* ÉS *IN VIVO* FARMAKOLÓGIAI VIZSGÁLATA

Bevezetés

A gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító vegyületek új generációjának talán legígéretesebb célmolekulája a TRPV1 kapszaicin receptor (Szállási & Blumberg, 1999; Sololcsányi, 2002). A C-rostú szenzoros neuronok deszenzitizálása az alap kutatásokon túlmenően az egyik legintenzívebben kutatott fájdalomcsillapítási stratégia számos gyógyszergyárban (Novartis, Bayer, SmithKline, Johnson & Johnson, stb).

Biológiai illetve gyógyászati szempontból a fájdalomcsillapítás célja a nociceptorok érzékenységének csökkentése. Erre két lehetőség is kínálkozik. A TRPV1 megnyitását követő kalcium és nátriumion beáramlás olyan jelátviteli folyamatokat indít meg, melyek az

idegvégződés hosszú ideig tartó funkcionális blokkolását eredményezik (*szenzoros deszenzitizáció*). Kívánatos volna egy olyan vegyület kifejlesztése, mely előzetes izgatás nélkül specifikusan gátolná a receptorfunkciót, hiszen az izgalmi fázis hiánya (vagy csekély mértéke) egyben a fájdalmas (égető) érzés kiiktatását jelenti. A másik lehetőség a TRPV1 receptormolekula antagonistákkal történő szelektív farmakológiai gátlása. Ez utóbbi folyamat potenciálisan új típusú analgetikus hatásmechanizmus alapja.

Jelenleg csak kevés adat áll rendelkezésünkre a TRPV1 antagonisták *in vivo* hatásaival kapcsolatosan, pedig egy potens és szelektív blokkolóra nagy szükség lenne az alap kutatáshoz és a gyógyszerfejlesztéshez egyaránt.

Eredmények

1. Mikrofluorimetriás kísérleteinkben a 0,1, 0,5, 1 és 10 μM SB366791 inkubálás után a kapszaicinnel (0,33 μM , 3 sec) kiváltott kalcium-influx mértéke a 100%-nak tekintett kontroll csoporthoz képest $91,94 \pm 10,5\%$, $50,7 \pm 9,3\%$, $37,38 \pm 9,8\%$, $14,46 \pm 3,2\%$. Az SB366791 IC_{50} értéke 651,9 nM ebben a modellben.

2. A tracheapreparátumok idegvégződéseiből a kapszaicin több mint kétszeres mértékű SP kiáramlást eredményezett a bazális felszabaduláshoz viszonyítva. A 100 és 500 nM SB366791 előkezelés ezt a választ koncentrációfüggő módon, szignifikáns mértékben csökkentette. Azonban az elektromos téringerral kiváltott közel háromszoros SP felszabadulásra az SB366791 egyik alkalmazott koncentrációja sem volt hatással.

3. A kapszaicin térdízületre történő cseppentését követően 20 perccel váltotta ki a maximális, mintegy 38%-os ízületi vérátáramlás-fokozódást. Az előzetes SB366791 kezelés (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) szignifikánsan csökkentette minden mérési időpontban a kapszaicin vazodilatátoros hatását. Sem a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ SB366791, sem a 2 mg/kg CZP nem gátolta statisztikailag szignifikáns mértékben ezt a típusú kapszaicin választ.

4. Wistar patkányok rektális hőmérséklete a kapszaicin s.c. adását követően átlagban $1,68 \pm 0,3$ °C-kal csökkent. A 20 perces 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ SB366791 előkezelés közel 40%-os, szignifikáns csökkenést eredményezett a kapszaicin hipotermiát okozó hatásában. A 60 perces 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ SB366791 kezelés még eredményes volt, szemben a 120 perces kezeléssel. Az SB366791 kisebb dózisa (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) és a referencia vegyület CZP (2 mg/kg , i.p.) is hatástalannak bizonyult.

Balb/c egerekben sem az SB366791 (2 mg/kg, i.p.), sem pedig a CZP (5 mg/kg, i.p.) nem antagonizálta szignifikáns mértékben a kapszaicin hipotermiát okozó hatását.

5. A kapszaicin szembe cseppentése 3 percen belül $16,6 \pm 2,13$ védekező, szemtörlő mozdulatot eredményezett. Az 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ SB366791 20, 60 és 120 perces előkezelés 58,9, 57,7 és 35,5%-kal mérsékelte a kapszaicinnal kiváltott szemtörlő mozdulatok számát. Sem az 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ SB366791, sem pedig a 2 mg/kg CZP 20 perccel korábban történő alkalmazása nem befolyásolta statisztikailag a szemtörlési reflexet.

Következtetések

Az SB366791 koncentrációfüggő módon, szignifikánsan gátolta a kapszaicin által kiváltott kalciumion belépést TRG sejttenyészetben és a P-anyag felszabadulást izolált patkány tracheából. Az SB366791 IC_{50} értéke 651,9 nM-nak adódott a mikrofluorimetriás *in vitro* kísérleti modellben.

Elsőként bizonyítottuk, hogy a kapszazepinnel ellentétben a nagyobb dózisban alkalmazott SB366791 *in vivo* kivédte a kapszaicinnal kiváltott hipotermiát, a szemtörlési mozgást és a térdízületi vazodilatációt is. Hatása az *in vivo* eredmények tükrében erősen idő és fajfüggő.

Mindezek alapján kijelenthetjük, hogy az SB366791 a kapszazepinnél hatékonyabb TRPV1 receptor antagonistá *in vivo* és *in vitro* patkány modellekben egyaránt.

II. AZ N-OLEOILDOPAMIN ÉS ANALÓGJAINAK *IN VITRO* HATÁSELEMZÉSE

Bevezetés

A fájdalmas ingerek integrátoraként funkcionáló TRPV1 kapszaicin receptor egyes aktivátorai (vanilloid származékok, savas pH, fájdalmas hőinger) jól definiáltak, de endogén ligandját, az úgynevezett „endovanilloidot” még nem sikerült azonosítani.

A korábban endogén ligandnak vélt endokannabinoid anandamid (Zygmunt és mtsai, 1999), az egyes lipoxigenáz termékek, mint a 12-(S)-hidroxiperoxi-eikozanoidsav (12-HPETE; Hwang és mtsai, 2000), valamint az N-arachidonildopamin (NADA; Huang és mtsai, 2002;) mellett, a legújabb feltételezett jelölt a szarvasmarhaagyból 2003-ban izolált N-oleoildopamin (OLDA; Chu és mtsai, 2003), mely a noradrenalin metabolitjának oleinsavval képzett savamidja. Az OLDA azért is érdemel kitüntetett figyelmet, mert amellett, hogy

ötvenszer potensebb humán TRPV1 receptoron, mint patkány CB1-en, I-RTX-szel gátolható termális hiperalgéziát okozott viselkedési tesztben (Chu és mtsai, 2003).

A Magyar Tudományos Akadémia Központi Kémiai Kutató Intézetének közreműködésével célunk volt a szerkezet-hatás összefüggések alapján előállított OLDA és származékai (összefoglaló néven: *N-oleoilfeniletilaminok*) TRPV1 kapszaicin receptorra gyakorolt hatásainak *in vitro* farmakológiai elemzése.

Eredmények

1. A raciométrikus fura-2 festékkel töltött TRG neuronok és rTRPV1-HT5-1 sejtek Ca^{2+} -felvételének sejtszintű vizsgálatakor egyfajta vegyületet adtunk egymás után háromszor, 3-5 perces mosási periódusok közbeiktatásával. TRG neuronokban és rTRPV1-expresszázó sejtvonalban a kapszaicin (0,33 μ M, 10 sec), az OLDA (3 μ M, 20 sec) és a 3-MOLDA (10 μ M, 20 sec) által kiváltott kalcium-tranziensek (fura-2 fluoreszcencia növekedés) nagysága ismételt, rövididejű applikációkra egyre csökkent. Az általuk megvalósított deszenzitizációt, valamint a reakciók kinetikai eltéréseit demonstráltuk.

A 4-MOLDA (10 μ M, 20 sec) nem okozott kalciumion belépést egyik sejt típusban sem.

2. A kalciumizotóppal végzett kísérleteinkben rTRPV1-HT5-1 sejteken az OLDA ötször potensebb a 3-MOLDA-nál, de 50-szer kevésbé hatásos, mint a kapszaicin. Az OLDA és a 3-MOLDA a kapszaicinre adott maximális válasznak csupán 60%-t keltette.

A 4-MOLDA önmagában nem eredményezett kalcium-akkumulációt a kalciumizotóppal végzett kísérletsorozatunkban. Viszont, ha a 100 nM kapszaicinnal történő 10 perces áztatás előtt 15 perces előinkubálást végeztünk a 4-MOLDA különböző koncentrációival (0,1-100 μ M), a 4-MOLDA gyenge antagonistikus hatását tapasztalhattuk rTRPV1-HT5-1 sejteken.

Következtetések

A transzfektált sejtekben felvett koncentráció-hatás görbék alapján az RTX, a kapszaicin, az OLDA és a 3-MOLDA EC_{50} értékek 1,5 nM, 36 nM, 1,8 μ M és 9 μ M, sorrendben. Általánosságban elmondható, hogy az OLDA és a 3-MOLDA reakciók kinetikája lassúbb, mint a kapszaiciné mindkét sejt típusban. Viszont a rTRPV1-HT5-1 sejtekben az általuk indukált tachyfilaxis (gyengülő válaszok) mértéke kifejezettebb, mint szenzoros neuronok esetén.

A 4-MOLDA egyik tesztünkben sem okozott kalciumion belépést. Azonban a kapszaicin kalciumakkumuláló hatásának csökkenését tapasztaltuk a 4-MOLDA előinkubálás hatására, mely a vanilloid-típusú vegyületek 4-es pozícióban lévő hidroxilcsoportjának jelentőségét hangsúlyozza a receptorfunkcióban. Az előzetes kísérletek alapján a hatás IC_{50} értéke $\sim 4 \mu M$.

Habár a 3- és a 4-MOLDA szerkezetileg csupán az aromás rész 4. helyzetben lévő hidroxil-csoportjának meglétében/hiányában különbözik egymástól, ez az adottságuk szabja meg farmakológiai eltérő hatásukat.

III. A PROTEIN KINÁZ A ÉS C RELATÍV SZEREPE A TRPV1 RECEPTOR ÉRZÉKENYSÉGÉNEK MODULÁLÁSÁBAN

Bevezetés

A TRPV1 receptor integrátor molekula szerepe gyulladáscsökkentő hiperalgégiában jól ismert (Caterina és mtsai, 2000; Davis és mtsai, 2000; Szolcsányi, 2002). Patológias körülmények között sokféle endogén *algogén* szintetizálódik és/vagy szabadul fel a környező kötőszöveti sejtekből és a neuronális sejtek végződéseiből, melyek többek között PKA-t (pl. PGE_2) vagy PKC-t (pl. bradikinin, hisztamin, ATP) is aktiválhatnak (Aley & Levine, 1999, Aley és mtsai, 2000). Egyes prosztaglandinok (PGE_2), az anandamid, a forskolin, és a glutamát is cAMP-dependens PKA aktiválással befolyásolja a TRPV1 receptor funkcióját (Gu és mtsai, 2003; De Petrocellis és mtsai, 2001; Rathee és mtsai, 2002; Hu és mtsai, 2002). A bradikinin, a PMA, az ATP és az idegnövekedési faktor NGF pedig protein kináz C-függő, TRPV1 receptorra konvergáló „fájdalom útvonalakat” indukálnak (Vellani és mtsai, 2001; Sugiura és mtsai, 2002; Numazaki és mtsai, 2002; Shu & Mendell, 2001). Egyre nyilvánvalóbbá válik, hogy a TRPV1 termális érzékenységét foszfolipáz C- és protein kináz-kapcsolt mechanizmusok is regulálják (Tominaga és mtsai, 2001; Chuang és mtsai, 2001; Vellani és mtsai, 2001).

A fent említett tanulmányok többségében *in vitro* megfigyeléseket végeztek TRPV1-transzfektált nem-neuronális sejtekben vagy szenzoros neuronok szómáján, figyelmen kívül hagyva a perifériás nociceptorok *in vivo* jelentőségét. Ugyanakkor kevés publikációban hasonlították össze szisztematikusan a PKC illetőleg a PKA hatásait a TRPV1 receptor érzékenységére ugyanabban a modellben.

Célunk a stimulált illetve az alapaktivitású PKC és a PKA relatív jelentőségének összehasonlítása a TRPV1 receptor funkcióra *in vitro* és *in vivo* patkány modellekben.

Vizsgáltuk az egyes protein kináz modulátorok (inhibitorok és aktivátorok) hatását a kapszaicin, reziniferatoxin (RTX) és KCl által keltett kalcium-tranziensekre újszülött patkány trigeminális szenzoros neurontenyészetén (TRG sejttest), valamint az RTX-szel kiváltott fájdalmas hőküszöbcsökkenésre a perifériás idegvégződés (DRG végződés) szintjén is.

Eredmények

Kísérletünk kivitelezése úgy zajlott, hogy a két rövid ideig alkalmazott kapszaicin (0,33 μ M, 3 sec), RTX (1 nM, 7 sec) vagy KCl (50 mM, 2 sec) adás között vagy ECS mosás (5 perc, kontroll eset), vagy a megfelelő protein kináz inhibitor (5 perc), vagy aktivátor (10-30 sec) alkalmazása történt.

A kapszaicin kontroll csoport 186 neuronjában a második válasz $92,6 \pm 4,1\%$ -a az elsőnek. A kontroll RTX populációban a második RTX-indukált fura-2 szignál átlag R értéke az első $59,3 \pm 6\%$ -a. A kontroll mérések során a második KCl által kiváltott kalcium-szignál az első $93,8 \pm 2,9\%$ -a. Ezek az értékek a hatákszámítások összehasonlítási alapja.

1. A protein kináz inhibitorok hatása a kapszaicinnel keltett kalciumion-akkumulációra

A *cAMP-dependens protein kináz A szelektív inhibitora*, a *KT5720* (0,2 μ M, 5 perc) szignifikánsan gátolta a kapszaicin által kiváltott kalciumakkumuláció mértékét. A második válasz $33,7 \pm 5\%$ -a az elsőnek.

Sem a *protein kináz C szelektív inhibitor chelerithrin-klorid (chelerithrin)*; 10 μ M, 5 perc, $70,9 \pm 9,8\%$) sem pedig a *nem szelektív staurosporin* (1 μ M, 5 perc, $49,7 \pm 7,3\%$) nem módosította szignifikáns mértékben a kapszaicin által indukált tachyfilaxist.

2. A protein kináz inhibitorok hatása az RTX-szel keltett kalciumion-akkumulációra

A *KT5720* (0,2 μ M, 5 perc) szignifikánsan csökkentette az RTX által kiváltott kalcium-influx mértékét. A második válasz $34,2 \pm 2,8\%$ -a az elsőnek.

Sem a *chelerithrin* (10 μ M, 5 perc; $75,5 \pm 20\%$), sem pedig a *staurosporin* (1 μ M, 5 perc; $54,7 \pm 7\%$) hatása statisztikailag nem különbözött az RTX kontrolltól.

3. A protein kináz aktivátorok hatása a kapszaicinnel kiváltott kalciumion-akkumulációra

A dibutilil-ciklikus-adenozin-5'-monofoszfát (dbcAMP, 200 μ M, 15 sec) egy olyan sejtp permeabilis cAMP-analóg, mely a kapszaicinnel kiváltott kalcium-influx mértékét $156,7 \pm 27,2\%$ -ra emelte.

A PKC szelektív és potens aktivátora, a forbol 12-mirisztát 13-acetát (PMA, 1 μ M, 10 sec) 148,1 \pm 27,4%-ra facilitálta a kapszaicin kalciumion-akkumuláló képességét.

A *protein kináz A* szelektív aktivátora, a *forskolin* (0,1 μ M, 30 sec) az adenilil-cikláz stimulációján keresztül növelte ugyan a kapszaicin-válaszát (123,8 \pm 14,7%), de az észlelt változás statisztikailag nem volt szignifikáns.

4. A protein kináz inhibitorok és aktivátorok hatása a hiperkalémiás oldattal kiváltott kalciumion-akkumulációra

Egyik említett protein kináz inhibitor sem csökkentette szignifikánsan a KCl-dal kiváltott választ. A *KT5720*, a *chelerithrin*, a *staurosporin* inkubálás után a jel nagyság sorrendben 99,9 \pm 7,6%, 91,6 \pm 1,9% és 97,3 \pm 2% maradt.

Hasonlóképpen, egyik alkalmazott protein kináz aktivátor sem befolyásolta a feszültségfüggő kalciumcsatornákon belépő ionmennyiséget, mivel a *dbcAMP* és a *PMA* kezelések után 88,3 \pm 2 % és 90,3 \pm 2,7% maradt az $R_{2\text{átl}}/R_{1\text{átl}}$ értékek aránya.

5. A protein kináz inhibitorok és aktivátorok hatása az RTX-szel kiváltott hőküszöbcsökkenésre a nociceptív idegvégződések szintjén

Az RTX (0,5 μ M, 100 μ l) *in vivo* hőküszöbcsökkenéső hatását a *KT5720* (0,2 μ M, 50 μ l; 37,95%) és a *staurosporin* (1 μ M, 50 μ l; 57,3%) is szignifikáns mértékben csökkentette. A *chelerithrin* (5 μ M, 50 μ l) nem módosította statisztikailag az RTX *in vivo* effektusát.

Mind a *forskolin* (2,5 μ M, 50 μ l; 222%), mindpedig a *PMA* előkezelés (1,6 μ M, 50 μ l; 218%) jelentősen facilitálta az RTX (0,05 μ M, 100 μ l) hőküszöbcsökkentő képességét.

Egyik vizsgált enzimmodulátor sem befolyásolta önmagában, RTX adás nélkül, a fájdalmas hőküszöböt 5, 10, 15 és 20 perccel az i.pl. adás után.

Következtetések

Szemben a szelektív PKC inhibitor chelerithrinnel és a nem specifikus protein kináz blokkoló staurosporinnal, egyedül a cAMP-dependens protein kináz A szelektív inhibitor *KT5720* csökkentette szignifikánsan a kapszaicin és az RTX által kiváltott kalcium-tranzienst szenzoros neuronban. Az a tény, hogy a nociceptor végződéseken a *KT5720* mellett a *staurosporin* is szignifikánsan gátolta az RTX hőküszöbcsökkentő hatását, egyrészt az eltérő sejtes milliónek tulajdonítható, másrészt a *staurosporin* PKA gátló hatásának *in vivo* kifejeződésével magyarázható. Ugyanakkor mind a PKC, illetőleg mind a PKA aktivátorai

(dbcAMP, FSK és PMA) facilitálták a kapszaicin hatását mikrofluorimetriásan és a két utóbbi az RTX-ét az *in vivo* viselkedési modellben.

Egyik típusú enzimmodulátor sem befolyásolta a hiperkalémiás oldattal kiváltott kalcium-szignált szenzoros neuronban, mely arra enged következtetni, hogy a vizsgált enzimmodulátorok hatása a TRPV1 receptor szintjén mediálódik.

A jelenlegi *in vitro* és *in vivo* eredményeink tükrében kijelenthetjük, hogy fiziológiásan a TRPV1 receptor érzékenységének fenntartásában döntően a protein kináz A alapaktivitása játszik meghatározó szerepet, míg a protein kináz C nem befolyásolja a receptor nyugalmi státuszát. Mivel az alkalmazott enzimaktivátorok eredményesen érzékenyítették a receptort agonistái iránt bizonyítást nyert, hogy mindkét vizsgált protein kináz stimulálása hatékony a receptor szenzitizált állapotának kialakításában mind centrálisan (TRG sejttest), mind pedig a perifériás érzőidegvégződések szintjén (DRG végződés).

IV. A TRPV1 RECEPTOR-MEDIÁLT INTRACELLULÁRIS KALCIUMIONSZINT EMELKEDÉS VIZSGÁLATA EXTRACELLULÁRIS KALCIUM HIÁNYÁBAN

Bevezetés

A kapszaicinnel foglalkozó irodalom egyetért abban, hogy normál körülmények között a vanilloidokkal megnyitott TRPV1 receptorcsatorna komplexen át a kalciumionok a koncentrációgradienst követve az extracelluláris folyadékból lépnek be a citoszolba. Az intracelluláris szabad kalciumion koncentráció átmeneti emelkedésének egyik fiziológiás következménye a szenzoros neuronok kapszaicin válaszainak deszenzitizációja illetve tachyfilaxisa, melynek extracelluláris kalciumtól függő természetét többen megerősítették (Cholewinski és mtsai, 1993; Garcia-Hirshfield és mtsai, 1995; Koplas és mtsai, 1997; Mandadi és mtsai, 2004).

Feltételezik, hogy az intracelluláris raktárak (ER) membránjában található TRPV1 receptor képes az ER kiürítésével az intracelluláris szabad kalciumion koncentráció növelésére extracelluláris kalcium hiányában is (Oláh és mtsai, 2001; Marshall és mtsai, 2003; Eun és mtsai, 2001; Oláh és mtsai, 2001; Liu és mtsai, 2003). Mások viszont megkérdőjelezték az ER-lokalizált TRPV1 receptor szerepét szenzoros neuronban (Cholewinski és mtsai, 1993; Garcia-Hirshfield és mtsai, 1995).

Megvizsgáltuk, hogy az általunk használt sejttypusok produkálnak-e extracelluláris kalciumtól független TRPV1-mediált választ.

Eredmények

A *fluoreszcens intracelluláris kalciumionszint-mérés* kivitelezése a korábbiakhoz képest csak az ECS összetételében módosult.

1-es típusú oldat: fura-2 festéket tartalmazó inkubációs oldatból és az ECS-ből is kihagytuk az 1 mM kalciumkloridot (CaCl_2).

2-es típusú oldat: az 1-es típusú oldatot kiegészítettük 3 mM EGTA-val.

A normál összetételű ECS-sel végzett kontroll kísérleteinkben szignifikáns különbséget tapasztaltunk a kapszaicinnal kiváltott (1 μM , 10 sec) kalcium-tranziensek nagyságában a rTRPV1-HT5-1 sejtek és a TRG neuronok között. A maximális fluoreszcencia növekedések átlaga (R) az előbbiben $0,62 \pm 0,03$, az utóbbiban pedig $0,377 \pm 0,02$. *Fischer statisztikai tesztje* alapján a két sejtpopulációban a reagáló sejtek aránya közel azonos mértékű, ~70%.

Az 1-es típusú oldat alkalmazása szignifikáns mértékben csökkentette a kapszaicin hatására kialakuló reakciót mindkét vizsgált sejtípus esetén. A maximális fluoreszcencia növekedések átlaga (R) rTRPV1-HT5-1 sejteknél $0,029 \pm 0,003$, a szenzoros neuronpopulációban pedig $0,026 \pm 0,006$. *Fischer teszt* alapján a két sejtpopuláció reagáló sejtjeinek arányában nincs statisztikailag definiálható különbség.

A 2-es típusú oldat alkalmazásakor megbízható méretű és értékelhető válaszokat nem észleltünk egyik sejtípusban sem.

Következtetések

Normál összetételű ECS-sel hígított 1 μM kapszaicin a rTRPV1-HT5-1 sejtekben közel kétszer akkora R értéket produkált, mint szenzoros neuronok esetén. Extracelluláris kalcium hiányában a rTRPV1-HT5-1 sejtvonal a TRG neuronokhoz hasonlóan nem eredményezett jelentős intracelluláris kalciumszint növekedést ($R < 0,03$).

A nominális kalciumion tartalmú 1-es típusú oldat alkalmazásakor a kismértékű, de még detektálható kapszaicin indukálta fura-2 intenzitásfokozódás a kalciumionokkal történő szennyeződés rovására írható. Az EGTA tartalmú kalciummentes közeg (2-es oldat) gyakorlatilag nullára csökkentette a kapszaicin válaszokat mindkét sejtfeleségben. A reagáló sejtek százalékos aránya a különböző összetételű ECS-ben hígított kapszaicin hatására a két alkalmazott sejtmodellben hasonló mértékű.

Eredményeink több laboratórium korábbi megfigyeléseit erősítik meg (Cholewinski és mtsai, 1993; Koplás és mtsai, 1997; Liu & Simon, 1998). Mások azonban az érzőneuronok

endoplazmás retikulumjaiból származónak vélik a regisztrált kismértékű kalciumion felszabadulást kalciummentes kísérleti körülmények között (Eun és mtsai, 2001; Oláh és mtsai, 2001; Liu és mtsai, 2003). Elképzelhető, hogy az alkalmazott sejttípus, az agonista, valamint az EGTA koncentrációjának különbségében keresendő az ellentmondás oka.

V. A TRPV1 KAPSAICIN RECEPTOR AKTIVÁLÁS ÉS A MITOKONDRIMUM FUNKCIÓ VIZSGÁLATA

Bevezetés

Szőke és munkatársai kísérleteikben kimutatták (2002), hogyha újszülött patkányokat kapszaicinnel vagy anandamiddal előkezelték, a 3. hétre antinocicepciót, a neurogén gyulladás megszűnését, a B-típusú szenzoros neuronok számbeli csökkenését tapasztalták.

Szolcsányi a primér szenzoros neuronok kapszaicinnel kiváltott tartós deszenzitizációjában jelentős szerepet tulajdonít az *in vivo* kísérletekkel igazolt morfológiai változásoknak, melyek talán a funkcionális történések mögötti károsodásnak tekinthetők, bár ezen összefüggés ok-okozati viszonya tisztázatlan (Szolcsányi és mtsai, 1975; Solcsányi 1993, 2005; Sándor & Szállási, 2005).

Célszerűnek véltük *in vitro* elemzéssel feltárni a TRPV1 receptor aktiválás és a mitokondrium funkció közötti kapcsolatot kettős fluoreszcens jelölés alkalmazásával. A mitokondrium funkció becslésére egy redisztribúciós, pozitív töltésű, lipofil kationfestéket (rhod-123) választottunk. E festék optikai tulajdonságai megengedik a relatív mitokondriális membránpotenciál ($\Delta\Psi_m$) mérés kombinálását a racionális, kalciumindikátor fura-2 festékre alapozott citoszolikus kalciumionszint változásának ($\Delta[Ca^{2+}]_{ic}$) egyidejű detektálásával.

Eredmények

Kísérleteinkben a kapszaicint 0,33 és 3,3 μ M koncentrációban 10-10 szekundumig alkalmaztuk. Minden egyes méréskor a kapszaicin csak egyféle koncentrációját adtuk egymás után háromszor, 3-5 perces mosási periódusok közbeiktatásával. A kísérletek végén alkalmazott H^+ -ionofór FCCP (karbonil-cianid 4-[trifluorometoxi]-fenilhidrazon, 5 μ M, 20 sec) a mitokondriális membránpotenciált reverzibilisen felfüggeszti, ezért a mitokondriumban tárolt kalcium a citoplazmába jut. A kapszaicinnel kiváltott szignálokat az FCCP által keltett

rhod-123 és fura-2 referenciajelekhez viszonyítottuk. Az eredmények első három pontjában csak az első kapszaicin-teszt reakciói kerültek kiértékelésre.

1. A kezdeti gyors kapszaicin-indukált fluoreszcencia intenzitásemelkedést több perces nagyságrendű visszatérési periódus követ mindkét jel esetén, melyek többnyire közel párhuzamos lefutásúak. A kapszaicin indukálta fura-2 szignál felfelé történő mozgása átlagosan 0,96 sec-mal megelőzte a kapszaicinnel keltett rhod-123 szignál változását.

A csúcsmplitúdók 50%-os szintjénél mért időparaméterünk, a „*félszélesség érték*” szolgált az adatok kvantitatív kiértékelésére, továbbá alkalmasnak bizonyult kvalitatív csoportosításukra is, ugyanis e két paraméter alapján (a csúcsmagasság 50%-nál mért 200 sec-os időkorlát) lehetségessé vált a hullámformák *tranziens* illetve *elhúzódó* jellegük szerinti besorolása.

2. A félszélesség adatok frekvencia eloszlása hisztogrammal ábrázolva *kétcsúcsú eloszlást* mutat sejttípustól és a kapszaicin koncentrációjától függetlenül. A tranziens és az elhúzódó reakciók százalékos megoszlása a két sejttípusban meglehetősen hasonló kis kapszaicin koncentráció esetén (0,33 μM). Azonban a mikromolos koncentrációjú kapszaicin (3,3 μM) által kiváltott fura-2 és rhod-123 reakciók félszélesség értékei szignifikánsan eltértek egymástól a két sejttípusban.

3. TRG neuronokban a kapszaicin koncentrációdependens módon hatott: minél nagyobb a koncentráció, annál nagyobb ${}_1R$ és ${}_1\Delta F$ maximális csúcserőket mértünk. (A bal oldali alsó index a kapszaicin applikáció sorszámát jelzi.) A 3,3 μM kapszaicin háromszoros ${}_1\text{kapszaicin/FCCP}$ fura-2 arányt eredményezett a 0,33 μM -hoz viszonyítva (518% és 166%, értelemszerűen) TRG neuronban. Ugyanez a ${}_1\text{kapszaicin/FCCP}$ arány a rhod-123-ra 70% és 26%, külön-külön.

A rTRPV1-HT5-1 sejtek esetén más a helyzet, mivel az FCCP a korábban kapszaicinnel már stimulált HT5-1 sejtekben nem okozott további $\Delta\Psi_m$ -met, ezért a TRG-nél felvázolt ${}_1\text{kapszaicin/FCCP}$ aránypár ennél a sejtmodellnél nem értelmezhető.

4. TRG neuronokban a háromszor ismételt, rövid idejű (10-10 sec) kapszaicin stimuláció szignifikánsan kisebb intracelluláris kalciumionszint növekedést eredményez a rTRPV1-HT5-1 sejtekben kapott adatokhoz képest. A kis koncentrációjú kapszaicin (0,33 μM) ismételt alkalmazásakor a receptor deszenzitizáció hasonló mértékű a két sejtmodellben, de csak a

transzfektált sejtekben szignifikáns. Szenzoros neuronban a nanomoláris koncentrációban adott kapszaicin gyors és reverzibilis intracelluláris kalciumszint növekedése az esetek döntő többségében nem társult jelentős mitokondriális depolarizációval a rTRPV1-HT5-1 sejtek esetén tapasztaltakkal összevetve.

Azonban a *rTRPV1-HT5-1 sejtekben* a 0,33 μM kapszaicin első applikációja kétszer markánsabb fura-2 és rhod-123 szignált produkált, mint TRG neuronokban a mikromolós koncentrációjú kapszaicin és további membránpotenciál csökkenést már nem tapasztaltunk a kísérlet végén alkalmazott FCCP adásakor. Meglepetésünkre, a nagyobb koncentrációjú kapszaicin (3,3 μM) nem a várt eredményre vezetett, ugyanis kisebb kalciumakkumulációt produkált, amit közel ugyanakkora $\Delta\Psi_m$ követett, mint 0,33 μM kapszaicin esetén.

Következtetések

Az előző (IV.) alfejezet egyik fontos következtetése a feltűnő hasonlóság a kétféle sejtmodell válaszkészségében. Ezt a hasonlóságot a relatív $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$ és a $\Delta\Psi_m$ szimultán mérése során is megtaláltuk, de csak a nanomoláris kapszaicin koncentráció alkalmazása esetén.

A két vizsgált fluoreszcens szignál *időparaméterei és csúcsamplitúdói* alapján komplex kapcsolat tételezhető fel a $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$ és a $\Delta\Psi_m$ viszonyában. A reakciók leszálló szárának *transziens* illetve *elhúzódó* csoportba történő kategorizálása egyszerűsíti az összehasonlítást és ez a tulajdonság függetlennek tűnik a sejt természetétől, az alkalmazott kapszaicin koncentrációjától és a kapszaicin inzultusok sorszámaától.

A nanomoláris koncentrációban adott kapszaicin ismételt expozíciója receptor deszenzibilizációt okozott kifejezetebb mitokondriális funkcióvesztés jelei nélkül TRG neuronokban. Ezen sejtekben a kapszaicin koncentrációjának növelésekor (3,3 μM) a kapszaicin receptort deszenzibilizáló valamint mitokondriális membránt depolarizáló képessége is kifejezetebb, de a transzfektált sejtekben kapott értékek csupán fele.

A rTRPV1 receptorral transzfektált sejtekben a 0,33 μM kapszaicin első applikációja markáns és komplett $\Delta\Psi_m$ esést produkált, melyet a kapszaicin koncentrációjának 3,3 μM -ra történő emelése már nem tudott szignifikáns mértékben tovább fokozni.

LEGFONTOSABB ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Az SB366791 ígéretes és megbízható TRPV1 receptor antagonistának és ezáltal egy potenciális fájdalomcsillapító kifejlesztésére alkalmas molekulának bizonyult *in vitro* és *in vivo* egyaránt.

2. Az OLDA kellő hatékonysággal aktiválta és deszenzibilizálta a TRPV1 receptort, hogy endogén ligand szerepét kijelenthessük. Szubsztituált származékai (3- és 4-MOLDA) ellentétes farmakológiai hatást gyakoroltak a TRPV1 receptorra, mely arra enged következtetni, hogy a vanilloid jellegű vegyületek aromás részének 4-es pozíciójában lévő hidroxilcsoportja különösen fontos a receptor aktiválása szempontjából. Egy kémiai csoport szubsztitúciója azt eredményezte, hogy a 3-MOLDA (az OLDA-nál ötször gyengébb) TRPV1 agonistának, a 4-MOLDA pedig receptor antagonistának bizonyult.

3. A TRPV1 receptor érzékenységének fenntartásában döntően a protein kináz A alapaktivitása játszik meghatározó szerepet, míg a protein kináz C nem befolyásolja a receptor nyugalmi státuszát. Mivel az alkalmazott enzimaktivátorok eredményesen érzékenyítették a receptort agonistái iránt bizonyítást nyert, hogy mindkét vizsgált protein kináz stimulálása hatékony a receptor szenzitizált állapotának kialakításában mind centrálisan (TRG sejtest), mind pedig a perifériás érzőidegvégződések szintjén (DRG végződés).

4. Az általunk használt egyik sejttípus sem produkált kalcium-independens TRPV1-mediált választ kalciummentes kísérleti körülmények között. Véleményünk szerint, az endoplazmás retikulumban lévő TRPV1 receptorok mennyisége nem jelentős és csak olyan nagy koncentrációjú kapszaicinnal lenne aktiválható, mely már nemcsak a receptorális hatások kiváltására alkalmas.

5. Összefüggést találtunk a kapszaicin koncentrációjának növelése (0,33 és 3,3 μM) és a receptor deszenzitizáció mértéke között, valamint a koncentráció és az indukált mitokondriális membránpotenciál változás viszonyában TRG neuronokban. Ezek a korrelációk viszont nem voltak érvényesek a transzfektált sejtekre.

Közismert a kapszaicin TRPV1 receptort deszenzitizáció hatása, mely tartós ugyan, de reverzibilis. Észrevételünk, hogy a deszenzitizáció mechanizmusában a mitokondriális történések lényeges szerepet játszhatnak, de jelen kísérleteinkben trigeminális neuronokban a

kapszaicin nem okozott olyan mértékű és jellegű változást, melyből a mitokondrium funkcionális károsodására lehetne következtetni.

6. A II., a IV. és az V. témakörök eredményei alapján a rTRPV1 receptort expresszáló HT1080 sejtvonal a szenzoros neuronok kitűnő modelljének tekinthető és ezeken a transzfektált sejteken a kapszaicin TRPV1 funkcióra gyakorolt *akut* illetve *longterm* hatásai *in vitro* megbízhatóan és eredményesen tanulmányozhatók.

7. A fenti eredmények módszereinek bevezetése a PTE Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetébe megnyitotta a lehetőséget a TRPV1 receptoron ható gyógyszerek fejlesztéséhez. A nagy hatékonyságú (high throughput screening, HTS) *in vitro* módszerek elindításához az értekezés eredményei kitűnő kiinduló- és támpontot jelentenek.

A TÉZIS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Angelika Varga, József Németh, Árpád Szabó, Jason J. McDougall, Chunfen Zhang, Krisztián Elekes, Erika Pintér, János Szolcsányi, Zsuzsanna Helyes: Effects of the novel TRPV1 receptor antagonist SB366791 *in vitro* and *in vivo* in the rat
Neuroscience Letters **385**, pp. 137-142, 2005 (IF: 2,019)

Angelika Varga, Kata Bölcskei, Éva Szőke, Róbert Almási, Gábor Czéh, János Szolcsányi, Gábor Pethő: Relative roles of protein kinase A and protein kinase C in modulation of TRPV1 receptor responsiveness in rat sensory neurons *in vitro* and peripheral nociceptors *in vivo*
Neuroscience 2006 (nyomtatásban, IF: 3,456)

János Szolcsányi, Zoltán Sándor, Gábor Pethő, **Angelika Varga**, Kata Bölcskei, Róbert Almási, Zsuzsanna Riedl, György Hajós, Gábor Czéh: Direct evidence for activation and desensitization of the capsaicin receptor by N-oleoildopamine on TRPV1-transfected cell, line in gene deleted mice and in the rat
Neuroscience Letters **361**, pp. 155-158, 2004 (IF: 2,019/2=1,0095)

Zoltán Sándor, **Angelika Varga**, Péter Horváth, Barbara Nagy, Zoltán Szilvássy, János Szolcsányi: Construction and analysis of a new stable cell line expressing the rat TRPV1 receptor
Cellular and Molecular Biology Letters **10**, pp. 499-514, 2005 (IF: 0,495)

Angelika Varga, Zoltán Sándor, Zsolt Balla, Gábor Czéh, János Szolcsányi: Relative changes of intracellular calcium level and mitochondrium membrane potential simultaneously induced by capsaicin
(közlésre előkészített kézirat)

A tézis alapját képező idézhető előadáskivonatok száma: 6
A tézis alapját képező előadások száma: 9
A tézis alapját képező poszterek száma: 17
A tézis alapját képező publikációk összesített impakt faktora: 6,9795

A TÉZIS ALAPJÁUL NEM SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Balázs Jakab, Zsuzsanna Helyes, Kata Böleskei, **Angelika Varga**, Árpád Szabó, Katalin Sándor, Krisztián Elekes, Rita Börzsei, Erika Pintér, József Németh, János Szolcsányi: Examination of the novel TRPV1 receptor antagonist JYL1421 (SC0030) *in vitro* and *in vivo* in the rat
Eur J Pharmacol. **517**, pp. 35-44. 2005 (*IF*: 2,432)

Rudolf Gesztelyi, Judit Zsuga, Agnes Cseppento, Agnes Bajza, **Angelika Varga**, Judit Szabo, József Szentmiklosi: Special sensitization pattern in adenisine-induced myocardial responses after thyroxine-treatment
J. Pharmacol. Sci. **91**, pp. 295-304, 2003 (*IF*: 1,419)

A tézis alapját nem képező egyéb idézhető előadáskivonatok száma: 2
A tézis alapját nem képező poszterek száma: 4
A tézis alapját nem képező publikációk összesített impakt faktora: 3,851

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt Dr. Barthó Loránd Professor Úrnak szeretném hálámat kifejezni, hogy lehetővé tette számomra, hogy intézetében végezhessem Ph.D tanulmányaimat és Dr. Szolcsányi János akadémikusnak, a Neurofarmakológia Program vezetőjének, amiért ösztönzött munkám elvégzésében.

Köszönettel tartozom témavezetőimnek Dr. Czéh Gábor Professor Úrnak és Dr. Sándor Zoltánnak munkám során nyújtott szakmai irányításukért és baráti támogatásukért. Szerzőtársaimnak, Dr. Helyes Zsuzsannának és Dr. Pethő Gábornak a PTE Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet munkatársainak őszintén köszönöm hasznos tanácsaikat és segítő pártfogásukat.

A patkány trigeminális ganglionsejt tenyészet készítésének és az intracelluláris kalciumionszint-változás technikájának alapos elsajátítását Dr. Szőke Évának köszönhetem. A kettős fluoreszcens festés szimultán méréstechnikájának sikeres kivitelezésében Dr. Balla Zsolt egykori kollégám tevékenyen közreműködött. Külön köszönet illeti Dr. Böleskei Katát, aki számos felmerülő probléma megoldásában nélkülözhetetlen segítségemre volt.

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni közvetlen munkatársaimnak, Buzásiné Annának és Disztl Cecéliának, hogy az elmúlt 4 év során kifogástalan asszisztenciájukkal járultak hozzá munkám kiteljesedéséhez. Hálás vagyok az intézet valamennyi dolgozójának, hogy biztosították számomra a nyugodt, oldott légkört, melyben könnyebben haladt a munka.

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom páromnak és családomnak, türelmükért, megértésükért, amiért végig mellettem álltak minden nehézségben és gondoskodó szeretetükkel biztosították tanulmányaimat.

