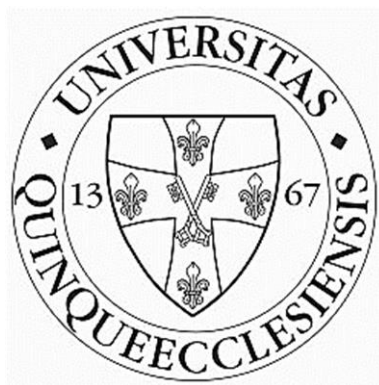


**Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1 és Ankirin 1 receptorok
aktivációs és gátló mechanizmusainak *in vitro* és *in vivo* vizsgálata**

Doktori (PhD) értekezés tézis



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. KUTATÁSI KONCEPCIÓ

Napjainkban széles körben kutatják a krónikus gyulladáscsökkentő 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 mellékhatásprofilal 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) ioncsatornák fájdalomban és gyulladásban betöltött szerepének és működési mechanizmusuknak minél pontosabb megismerése.

II. BEVEZETÉS, IRODALMI HÁTTÉR

1. A fájdalom és fájdalomcsillapítás kutatása

A fájdalom 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 fájdalom kezelésére. A neuropátiás fájdalom a perifériás vagy központi idegi apparatus károsodása vagy megbetegedése révén jön létre. Az NSAID gyulladáscsökkentők és fájdalomcsillapítók a ciklooxygenáz (COX) enzim gátlásával csökkentik a prosztaglandin szintézist, és a gyulladáskeltő neuropeptidok 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 és származékaik nagy dózisban ugyan csökkentik a neuropátiás tumoros fájdalmat, viszont súlyos mellékhatásaik (pl. gasztrointesztinális vérzések), valamint a velük szemben kialakuló tolerancia miatt nem alkalmazhatók hosszú távon. 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 végzések jellemzése és a kapszaicin receptorának azonosítása.

2. A TRPV1 és a TRPA1 receptorokat expresszáló kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződések hármaskörű funkciója és szerepe a fájdalomban és neurogén gyulladásban

A kapszaicin specifikus receptorát, a TRPV1 receptort expresszáló érző neuronok a vékony mielinhüvelyes (A δ -) 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 idegvégződésekben neurotranszmitterek - kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP) és tachykininek (pl. P-anyag, neurokinin A) - szabadulnak fel, melynek következtében vazodilatáció jön létre és a gyulladós sejtek (leukocita, makrofág, hízósejt) felhalmozódását követően plazmaprotein extravazáció 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).

Ezek az idegvégződések 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). 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).

3. TRPV1 és TRPA1 receptorok felépítése és funkciója

A TRPV1 receptor 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-végződéseiben expresszálódnak (Story és mtsai., 2003). 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 Ca^{2+} 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 neuropeptidok 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 (Choi és mtsai., 2014). Jelentős különbséget 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). A receptort

is erről nevezték el, ez az ismétlődés okozza feltételezhetően a receptor mechanikai érzékenységét (Nilius és mtsai., 2012).

A TRPV1 és TRPA1 receptorok aktivációjában számos endogén és növényi eredetű exogén kémiai anyag vesz részt. TRPV1 agonisták közül külön említendő a kapszaicin ultrapotens analógja az RTX (Szállási és Blumberg, 1990). A TRPV1 receptort továbbá a fájdalmas hőinger ($> 43\text{ °C}$) és az alacsony pH (< 6) is aktiválja (Tominaga és mtsai., 1998; Welch és mtsai., 2000; Szolcsányi, 2008; Cao és mtsai., 2013). TRPA1 receptor aktivációjában a mechanikai ingerek és fájdalmas hideg inger ($< 17\text{ °C}$) is részt vesznek, bár feltételezik, hogy emberben csak hozzájárul a hidegérzet kialakulásához, a hidegallodínia kialakításán keresztül (Katsura és mtsai., 2006). Az intracelluláris Ca^{2+} -szint növekedést követően a Ca^{2+} az N-terminálisan jelenlévő EF-hand doménen keresztül direkt módon képes aktiválni a TRPA1 receptort (Zurborg és mtsai., 2007). Fontos gyulladás folyamán felszabaduló endogén agonisták a szemikarbazid-szenzitív amin oxidáz (SSAO) termékei: hidrogén-peroxid, formaldehid és a metilglioxál (Eberhardt és mtsai., 2012). Kimutatták, hogy hidrogén-szulfid, valamint poliszulfid vegyületek is aktiválják a receptort (Pozsgai és mtsai., 2016). 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). 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 (Szöke és mtsai., 2010; Sággy és mtsai., 2015).

A TRPV1 receptor agonisták fejlesztésének két iránya közül az első a deszenzitizáció kialakulását veszi alapul, 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 következtében neuropátia alakult ki (Wallace és Pappagallo, 2011). Továbbá fázis II klinikai vizsgálatban az AlgrX-4975 (Adlea) vegyület egyetlen injekciója szignifikánsan csökkentette oszteoarthritisben szenvedő betegek fájdalomszintjét (Remadevia és Szallasi, 2008). A Civamid vagy másnéven Zucapsaicin krém formájában szintén alkalmasnak bizonyult az oszteoarthritis és a neuropátiás fájdalom bizonyos szintű csökkentésére (Salat és mtsai., 2014). 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(arylalkil)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 kerülnek 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 (Katsura és mtsai., 2006). Továbbá újabb kutatások kimutatták, hogy a TRPA1 receptoron másodlagos jelátviteli molekulák, mint például a Ca^{2+} 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 (Moparthy és mtsai., 2014). A csatorna kapuzási mechanizmusának ilyen fajta – N-terminális ankirin ismétlődéseken kívüli – befolyásolása lehetőséget ad a TRPA1 alapú gyógyszertéripiák finomhangolására.

A TRPA1 receptor szelektív antagonistája a HC030031, mely bizonyítottan gátolja a gyulladást és a mechanikai, valamint termális hiperalgészia 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.

4. A szemikarbazid-szenzitív amin-oxidáz szerepe a gyulladásban

A szemikarbazid-szenzitív amin-oxidáz (SSAO) enzim számos szövetben és sejtípusban jelen van, membránhoz kötött és plazmában oldott formában (Lyles, 1996). Expresszióját eddig főként vaszkuláris simaizom és endotél sejtekben, valamint adipocitákban mutatták ki (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 (H_2O_2) – keletkezik (Yu és mtsai., 2003). A H_2O_2 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).

A vaszkuláris adhéziós protein-1 klónozásakor igazolták, hogy szekvenciája megegyezik az SSAO enzimével (Smith és mtsai., 1998), mindezek alapján elmondható, hogy a gyulladásban leukocita adhéziós és enzimatis feladatokat egyaránt ellát a molekula. A leukocita extravazáció során irányítja a leukociták interakcióját vaszkuláris endotélsejtekkel (Stolen és mtsai., 2005), továbbá enzimatis funkciója révén részt vesz a leukocita-transz migráció irányításában (Salter-Cid, 2005).

Számos, főleg gyulladástos eredetű betegségben számoltak be az SSAO enzim emelkedett mennyiségéről és aktivitásról. Ilyenek például a diabétesz (Garpenstrand és mtsai., 1999), gyulladástos szem- és májbetegség (Almulki és mtsai., 2010), veseelégtelenség (Lin és mtsai., 2008), kongenitális szívelégtelenség (Boomsma és mtsai., 2002), Alzheimer-kór (Valente és mtsai., 2012) és szklerósis multiplex (Airas és mtsai., 2006). 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. Tehát az SSAO enzim működés gátlásával gyulladástscsökkentő hatást érhetünk el, így az SSAO-gátlóknak és azok fejlesztésének terápiai értéke lehet (Salter-Cid és mtsai., 2005). Az SSAO enzim irreverzibilis gátlószerei az oxim vegyületek, hidrazinszármazékok és allilaminok közül kerülnek ki (Hiraoka és mtsai., 1988).

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 szabadalmainak száma (Wang és mtsai., 2006). Több SSAO gátlóról bizonyították már, hogy rendelkeznek gyulladásgátló hatással (Hiraoka és mtsai., 1988; Salter-Cid és mtsai., 2005), azonban klinikai vizsgálatokig ezidáig csak nagyon kevés gyulladásgátlásban hatásosnak tűnő vegyület jutott 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 hatásspektrumúak - PXS-4159A - bizonyultak (Foot és mtsai., 2013).

A BTT-1023 elnevezésű humán monoklonális SSAO-ellen termeltetett antitestről preklinikai radioaktív izotópos vizsgálatok alapján leírták a becsült humán hatásos dózist (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. Ígéretes gyógyszerjelölt a múlt év elejére szintén fázis II vizsgálatig jutott PXS-4728A jelű vegyület, melyről leírták, hogy kulcsmolekula lehet a krónikus obstrukzív tüdőbetegség, valamint intersticiális vesefibrózis kezelésében (Jarnicki és mtsai., 2016).

5. 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, mely szelektíven ható, több támadáspontú gyulladáscsökkentővé válhat (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 inhibitorból a szervezetbe kerülve metabolikus bioaktiváció útján a COX enzim gátló oxaprozín 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 extravazáció gátlásával fejt ki hatását (Helyes és mtsai., 2014; Tábi és mtsai., 2013), de pontosabb *in vitro* hatásmechanizmusáról ismereteink még hiányosak voltak. 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 (Horváth és mtsai., 2017).

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 (Fillingim és mtsai., 2009). Magasabb fájdalom küszöb és tolerancia figyelhető meg nőknél a folliculáris fázisban, mint a luteális fázisban (Riley és mtsai., 1999). Továbbá kísérleti adatok bizonyítják, hogy rágcsálóknál magasabb szenzitivitás figyelhető meg nőstényeknél, ami szintén függ az ösztroosz ciklustól (Lacroix-Fralish és mtsai., 2006). 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 ER α és ER β receptorok expresszálódnak a primer szenzoros neuronokon, elsődlegesen a kis és közepes átmérőjű nociceptorokon (Papka és mtsai., 2002). A 17 β -ösztradiol (E2) hatást fejt ki szenzoros neuronok ER α receptorain, a fájdalom közvetítés modulálásán keresztül (Bereiter és mtsai., 2005). A klasszikus nukleáris ER-ok mellett a membránban lokalizálódott G protein-kapcsolt ösztrogén receptor (GPER1) szintén jelen van a primer szenzoros neuronokon (Lu és mtsai., 2013), és bizonyították, hogy a gerincvelői szomatoszenzoros rendszeren keresztül gyors, nem-genomikus E2 szignalizációjú fájdalom modulációt eredményez (Takanami és mtsai., 2010).

Primer szenzoros neuronokon kimutatták 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 (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 ER α és ER β génhíányos 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 termonoczeptív hatásaira.

III. 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 tenyészetben *in vitro* módszerekkel.

IV. KÍSÉRLETI MODELLEK

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 génhányos (TRPV1^{-/-}) egereket használtunk (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 ovariectomiát (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.

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 kollagenázt (Type XI, 1 mg/ml) tartalmazó PBS oldatban, majd 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 sejt kultúrát poly-D-lizinnel bevont üveg fedőlemezekre szélesztettük, és alacsony glükóztartalmú Dulbecco's-Modified Eagle Medium (D-MEM) tápoldatban növesztettük, mely tartalmazott lószérumot, szarvasmarha albumint, inzulin-transzferrin-szelenium-S-t, putreszcin-dihidrokloridot, trijód-tironint, progeszteront, penicillint, sztreptomocint, idegi növekedési faktort (NGF). A tenyészetet 37 °C-os termosztátban, 5%-os CO₂ tartalmú közegben tartottuk fenn, és minden másnap NGF-et adtunk a sejtekre. A kísérletekhez 1-3 napos tenyészeteket használtunk (Szőke és mtsai., 2000).

3. TRPV1 és TRPA1 receptor-expresszáló sejtvonalak

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

V. VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

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 festékkel inkubáltuk, mely festék képes a szabad Ca²⁺ megkötésére. Ezzel a technikával határoztuk meg a kapszaicin- (CAPS) és allyl-isothiocyanát (AITC)-kiváltotta kalcium áramokat TRG és DRG neuronokon (Szőke és mtsai., 2000).

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

nM) hatását vizsgáltuk a CAPS és az AITC aktivációra. Továbbá a tradicionális TRPA1 antagonistá HC030031 (10 μ M) és a TRPV1 antagonistá 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.

2. Radioaktív ⁴⁵Ca²⁺-felvétel vizsgálatok

A TRPA1 és TRPV1 receptor-expresszáló CHO sejteket 72-lyukú plate-en tenyésztettük D-MEM tápoldatban, egy lyuk körülbelül 4000 sejtet tartalmazott. Egy nap elteltével a sejteket Ca²⁺ mentes Hank's oldatban oldott tesztoldat és ⁴⁵Ca²⁺ izotóp elegyében inkubáltuk. ECS oldattal történő mosást után a sejteket tartalmazó tenyésztőedényt 75 °C-ra helyeztük, majd 0,1%-os nátrium-dodecil-szulfáttal lizáltuk. A lizátum radioaktivitását szcintillációs folyadékban Packard Tri-Carb 2800 TR számlálóval mértük.

TRPA1 expresszáló CHO sejt vonalon SZV-1287 100 nM, 500 nM, 1, 5 és 10 μ M-os koncentrációjával 60 percig 37 °C-on inkubáltuk a sejteket, majd 200 μ M AITC-vel váltottuk ki a sejtek izotóp felvételét. Az SZV-1287 előbbieken 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.

3. CGRP felszabadulás mérése radioimmunoassay (RIA) módszerrel

A patkány tracheákat thiopentál (50 mg/kg i.p.) altatást követően kipreparáltuk, majd oxigenizált 37 °C-os Krebs oldatot (pH 7,2) tartalmazó szervfürdőben perfundáltuk, a neuropeptid szint egyensúlyi állapotának elérése érdekében. Majd az oldatot lecserélve 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 μ M) illetve a szelektív TRPV1 agonista CAPS-nel (100 nM).

A CGRP koncentrációkat a szervfürdőkből vett 200 μ l térfogatú mintákból RIA módszerrel meghatároztuk. A légcsöveket lemérve a CGRP felszabadulás mértékét fmol/mg nedves szövetsúlyra vonatkoztatva fejeztük ki (Németh és mtsai., 1998).

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., Cincinnati, OH, USA) és Direct-Zol RNS kittel történ, a gyártó utasításainak megfelelően. Az RNS mintákat Dnase1 (Zymo Research, Irvine, CA, USA) kezelést követően kvantifikáltuk spektrométerrel (NanoDrop ND-1000). 1 μ g tisztított RNS-t reverz transzkripcióval komplementer DNS-sé (cDNS) Maxima™ First Strand cDNA Synthesis Kit használatával. A qPCR-t Stratagene Mx3000P QPCR System-mel végeztük, referencia génként gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenázt (GAPDH) használtunk. Minden reakcióban 20 ng cDNS-t használtunk, 1x Luminaris HiGreen Low ROX qPCR Master Mix-et alkalmaztunk és 0,3 μ M-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 reakciókhoz a következő gének expresszióját vizsgáltuk: Gapdh, Trpv1, GPER1, ER α , ER β . A mérések tartalmazták a disszociációs görbe analízist, az amplifikáció specifitásának igazolására. A relatív génexpressziós rátát a $\Delta\Delta C_t$ 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 termosztátban, 5% CO₂ tartalom mellett, illetve kezeletlen kontrollokat használtunk.

5. Mechanonociceptív küszöbérték mérése eszteziométerrel

A mechanonociceptív küszöbértéket a hátsó lábak talpi felszínének érintési érzékenységgel határoztuk meg, dinamikus plantáris eszteziométer (DPA, Ugo Basile 37400, Comerio, Olaszország) használatával. 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.

6. Termonociceptív küszöbérték mérése emelkedő hőmérsékletű forró lappal

A termonociceptív küszöbértéket a hátsó lábak talpi felszínének hőérzékenységgel határoztuk meg, emelkedő hőmérsékletű forró lap (IITC Life Science Woodland Hills, CA, Egyesült Államok) használatával. 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 rögzítettük, 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).

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 fázisát különítettük el (Mettus és Rane, 2003).

8. TRPV1 agonista RTX indukálta gyulladáshoz hiperalgémia vizsgálata

Akut neurogén gyulladást és ennek következtében létrejövő hiperalgémia létrehozásához 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 termonociceptív küszöbérték mérését 10 perc, 30 perc, 1 óra és 2 óra után végeztük az intraplantáris RTX adást követően.

9. 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. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 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 \pm SEM értékkel fejeztük ki, három független kísérlet eredményiből. A génexpresszió és az E2 hatásának mikrofluorimetriás meghatározására Bonferroni féle post hoc tesztel kiegészített egyutas ANOVA-t használtunk. Az *in vivo* tesztek eredményeit csoportonként 8 állat eredményeiből kapott átlag \pm SEM értékeit egyutas ANOVA-val analizáltuk, melyet szintén Bonferroni féle post hoc tesztel egészítettünk ki. A mechanikai hiperalgèzia vizsgálatokor 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 *** $p < 0,001$.

VI. EREDMÉNYEK

SZV-1287 TRPA1 és TRPV1 ioncsatornák aktivációra kiváltott hatásának vizsgálati eredményei

1. Az SZV-1287 gátolja a TRPA1 receptor által közvetített Ca^{2+} -beáramlást TRG sejttenyészet neuronjaiba

A TRPA1 agonista AITC-re (200 μM) reagáló neuronok százalékos arányát fluoreszcens Ca^{2+} -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. Az SZV-1287 100, 500 és 1000 nM koncentrációjának hatására koncentráció-függő módon és szignifikánsan csökkent a Ca^{2+} -beáramlás TRG neuronok citoplazmájába. Annak megerősítésére, hogy a TRPA1 részt vesz a Ca^{2+} -beáramlás létrejöttében, egy TRPA1 szelektív antagonistát, a HC030031-et használtunk. A HC030031 és AITC együttes alkalmazásakor szignifikánsan csökkent az AITC hatására kialakuló válasz.

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 azonban nem volt hatással a TRPA1 aktivációra. Az SZV-1287 és LJP 1207 oldószerei nem okoztak változást a Ca^{2+} -beáramlásban.

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.

2. Az SZV-1287 gátolja a TRPV1 receptor által közvetített Ca^{2+} -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) Ca^{2+} -beáramlás volt megfigyelhető. A CAPS és a 100, 500 és 1000 nM koncentrációjú SZV-1287 együttes adásakor a kalciumválasz

koncentráció-függő csökkenést mutatott. A TRPA1 szelektív antagonistája 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 SZV-1287 és LJP 1207 oldószerei nem okoztak változást a Ca^{2+} -beáramlásban.

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

Az SZV-1287 100, 500 és 1000 nM-os koncentrációja szignifikánsan és koncentráció-függő módon gátolta az AITC aktiváció által kiváltott CGRP felszabadulást a magasabb koncentrációkban. A TRPV1 aktivációt követő CGRP felszabadulást az SZV-1287 nem csökkentette jelentősen.

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.

4. Az SZV-1287 gátolja az AITC és a kapszaicin által indukált Ca^{2+} -beáramlást és $^{45}Ca^{2+}$ izotóp felvételt TRPA1 és TRPV1 expresszálo CHO sejtekbe

Kontroll körülmények között 200 μ M AITC által és 330 nM CAPS-nel kiváltott Ca^{2+} -influxot a TRPA1 illetve TRPV1 receptort expresszálo sejtek 96% illetve 97%-ában detektáltunk. SZV-1287 1, 5 és 10 μ M koncentrációjú 60 perces előinkubálást követően TRPA1 expresszálo CHO sejtekbe az intracelluláris kalciumbeáramlás koncentráció függő módon csökkent. A korábban leírt koncentrációjú és idejű SZV-1287 kezelés után a TRPV1-expresszálo CHO sejtek stimuláció hatására történő Ca^{2+} felvétele mindhárom koncentráció esetében hasonlóan jelentős mértékben csökkent.

Az SZV-1287 100 nM, 500 nM, 1, 5 és 10 μ M-ja a $^{45}Ca^{2+}$ izotóp felvételt koncentráció-függő módon, szignifikánsan csökkentette. A hatóanyag IC_{50} értéke TRPA1 receptorra 2,39 μ M, míg TRPV1 receptorra 8,64 μ M, a radioaktív $^{45}Ca^{2+}$ felvételt mérő kísérletek alapján.

Az E2 TRPV1 ioncsatorna aktivációra kiváltott hatásának vizsgálati eredményei

1. Nemi hormon függő különbségek az egerek mechano- és termonocéptív küszöbértékében

A fájdalomérzetben mutatkozó esetleges nemi különbségek vizsgálatához mindkét nem mechanonocéptív és a termonocéptív küszöbértékeit megmértük. Megfigyeltük, hogy a proösztusz fázisban lévő C57BL/6J WT nőstény egerek hátsó mancs talpi felszínén mérve mind a mechano-, mind a termonocéptív küszöbértékek szignifikánsan alacsonyabbak, mint az ösztusz fázisban lévő nőstény, valamint a hím egerek küszöbértékei. A proösztusz fázisban a legmagasabb az egerek ösztrogén szintje, míg ösztusz fázisban ez a szint hirtelen lecsökken. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk az ösztrogén expozíció élettani hatásait a fájdalomérzetre, ösztusz fázisban lévő intakt nőstény egerek termo- és mechanonocéptív küszöbértékeit összehasonlítottuk bilaterálisan OVX egerek küszöbértékeivel. Ezek a küszöbértékek magasabbak voltak OVX egereknél, és szignifikánsan alacsonyabbak álműtött

egereknél proösztusz és ösztusz fázisban. A fájdalomküszöb értékei magasabbak voltak ösztusz, mint proösztusz fázisban.

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 mechano- és termonociceptív küszöbértékeket mértünk, mint a WT hímek és ösztusz fázisban lévő nőstények esetén. TRPV1^{-/-} egerek esetén azonban a nociceptív paraméterekben ösztusz és proösztusz fázis között nem volt megfigyelhető különbség, ugyanakkor a hímek mechanociceptív küszöbértéke magasabb volt a nőstényekénél.

3. TRPV1 aktiváció-indukálta mechanikai hiperalgémia 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 hiperalgémia alakult ki intraplantáris RTX (0,01 ng/ml) beadást követően, mind az E2 előkezelt, mind a kezeletlen állatok csoportjainál, a fiziológias sóoldatot kapott állatokhoz képest. 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 állatok csoportjai között, az E2 kezelés megnövelte a nociceptív választ 30 perc után, amint azt a hiperalgémia görbe lefelé történő eltolása mutatja, ami E2-indukált TRPV1 szenzibilizálót sugall. A sóoldat talpba történő injektálása nem okozott mechanikai hiperalgéziát.

4. ER α , ER β , GPER1 és TRPV1 mRNS expresszió primer szenzoros neuronokon

Annak tisztázása érdekében, hogy a primer szenzoros neuronok expresszálnak-e ösztrogén receptorokat (ER), megvizsgáltuk ER α , ER β és GPER1 mRNS expresszióját WT egerekből készített DRG kultúrákban. Mindhárom mRNS típust kimutattuk a kultúrában.

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.

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 mérésével vizsgáltuk.

A TRPV1 agonista CAPS (330 nM) nagy mértékű tranziens Ca²⁺-beáramlást okoz a sejtekbe, amit deszenzitizáció követ. Az oldószeres kontroll önmagában nem okozott Ca²⁺-beáramlást. A DRG neuronok egy napos 100 pM-os E2 előkezeltése megszüntette a CAPS által kiváltott TRPV1 receptorok deszenzitizációját.

Egy másik kísérletben öt egymást követő stimulációt ugyanazon neurontenyészetben alkalmaztunk, egy 50 perces periódus alatt. Először 10 másodperces CAPS (330 nM) stimulációt alkalmaztunk, mely tranziens Ca²⁺-akkumulációt okozott a citoszólban, melyet a

fluoreszcens jel növekedésével detektáltunk, majd a CAPS adását egy 10 perces kimosási periódust követően ismételtük meg. A második és a harmadik válasz mértéke fokozatosan csökkent, a TRPV1 receptor deszenzitizációja miatt. Ezt követően egy rövid (10 perces) E2 kezelés után a negyedik CAPS adáskor megfigyeltük, hogy az E2 megakadályozza a deszenzitizációt, de egy következő, E2 nélküli CAPS adás szignifikánsan kisebb választ eredményezett.

A kísérletsorozat harmadik részében az első és a második CAPS adást követően 10 perces E2 kezelést együtt alkalmaztunk egy TrkA receptor gátló szer (AG879) adásával. Ebben az esetben a harmadik CAPS okozta válasz szignifikánsan kisebb volt, mely a TRPV1 deszenzitizáció fennmaradására utal.

VII. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

Az SZV-1287 TRPV1 és TRPA1 antagonisták hatása

Az eredetileg az SSAO enzim gátlására kifejlesztett 3-(4,5-difenil-1, 3-oxazol-2-yl)propanal oxim vegyület, az SZV-1287 hatását vizsgáltuk a TRPA1 és TRPV1 receptorok aktivációjára, szenzoros neuronok sejttestjein és a perifériás idegvégződéseken. Elsőként bizonyítottuk, hogy az SZV-1287 mindkét kationcsatornára potens antagonisták hatást fejt ki. Jelentősen és koncentráció függő módon csökkentette az AITC és a CAPS által indukált Ca^{2+} -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 idegvégzések közel helyezkednek el a felszínhez, így könnyen aktiválhatók kémiai anyagokkal. Az ennek hatására felszabaduló neuropeptidok 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 idegvégzésekben mutatkozó aktivációs különbségek pontos molekuláris mechanizmusainak feltárására, feltételezzük, hogy a sejttest és az idegvégzések eltérő felépítése áll a háttérben. A sejttesten ugyan a CAPS elindított egy kisebb mértékű Ca^{2+} -beáramlást, de az endoplazmatikus retikulum gyorsan akkumulálta a citoplazma szabad kalcium-ionjait. Az idegvégzésekben 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 (Szöke 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). A TRPA1 ioncsatorna szerepét számos betegségmodellben dokumentálták, és mint fájdalomcsillapító gyógyszerként egyértelműen azonosított (Garrison és mtsai., 2011). Garrison és Stucky beszámolt a TRPA1 receptor szerepéről krónikus fájdalom kialakulásában, komplett Freund-adjuváns által indukált ízületi gyulladási 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 (Grace és mtsai., 2014), a kolitis (Kun 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 mtsai., 2007). 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 antagonist, primer szenzoros neuronokon, valamint receptorokat expresszáló sejtvonalakon. Ezért ígéretes új jelöltje lehet neuropátiás fájdalomra, migrénre és ízületi gyulladásra fókuszáló gyógyszerfejlesztésnek.

Az ösztradiol fájdalomban betöltött szerepe

Elsőként szolgáltatunk 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; 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 hiperalgémia 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 érzékenységet, hanem az expresszióját is növelte a TRPV1 receptoroknak, hasonlóan az endometrium sejtekéhez (Pohóczky és mtsai., 2016). Valamint a primer szenzoros neuronok expresszálják az ER α , ER β és GPER1 ösztrogén receptorokat. Bár ebben a mechanizmusban résztvevő ER-ok típusa nem meghatározott, valószínű, hogy az E2 változtatja meg a TRPV1 expresszióját a primer szenzoros neuronokban, az ösztrogén receptorokon keresztül. Bár az egy napos 1 nM-os E2 kezelés tekinthető farmakológiai kezelésnek, ennek a koncentrációnak nem volt hatása a kísérletünkben. Számos publikáció írja le, hogy az E2 farmakológiai dózisa csökkenti az ER-ok kifejeződését a neuronokban (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 ER α -t figyeltük meg, ER β -t nem (Puri és mtsai., 2011). Az exogén E2 adása növeli a TRPV1 expresszióját OVX patkányok szenzoros neuronjaiban, míg E2-hatás hiánya ER α KO és ER β KO egerekben TRPV1 expresszió csökkenést eredményez (Cho és Chaban, 2002).

Az E2 lehetséges hatásmechanizmusa fájdalomban

Korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan (Takanami és mtsai., 2010) mi is kimutattuk, hogy mindhárom ösztrogén receptor (ER α , ER β 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 hiperalgéria 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 hiperalgéria kialakulása figyelhető meg (An és mtsai., 2014). Kimutatták, hogy az E2 szint szabályozza a GPER1 expresszióját, és patkányok szenzoros neuronjaiban ovariectomia 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; Dennis és mtsai., 2009), az intracelluláris Ca²⁺-szint növekedés pedig stimulálja a PKC ϵ -t és fájdalomérzetet vált ki (Goswami és mtsai., 2007). PKC ϵ -on keresztüli foszforiláció célpontja a TRPV1 C-terminálisán megtalálható szerin 800 régió. Goswami és munkatársai a TRPV1 receptor C-terminálisát jelölik meg, mint az ösztrogén és a PKC ϵ jelátviteli eszközt, 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 keresztül hatásához (Flake és mtsai., 2005). 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 sejt felszíni membránban. Tíz perces NGF kezelés 1,6-szorosára növeli a membránban megtalálható TRPV1 expresszióját, TrkA és TRPV1-el transzfektált HEK293 sejtekben (Zhang és mtsai., 2005).

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 fájdalomérzékonységre 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 (Jeziński 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 potenciózott. 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 eredményünk is alátámasztja 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.

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). Általában a nőknél nagyobb a prevalenciája a muszkuloskeletális 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), ami ellentmond az E2 által indukált fájdalomérzékonyságnak. 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 (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 szolgáltatson 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.

VIII. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Bizonyítottuk, hogy az SSAO gátló vegyületünk, az SZV-1287 koncentrációfüggő módon és szignifikánsan csökkenti a TRPV1 és TRPA1 receptorok aktivációját szenzoros neuronokon, perifériás érőideg-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.
2. 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 termonocéptív 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 ovariectomizált egerek esetében exogén E2 hatására a mechanikai hiperalgészia 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 szolgáltatunk 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.

IX. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- Abraham** és mtsai., 2003 Estrogen receptor beta mediates rapid estrogen actions on gonadotropin-releasing hormone neurons in vivo. *J Neurosci*; 23(13):5771-7.
- Airas** és mtsai., 2006 . Elevated serum soluble vascular adhesion protein-1 (VAP-1) in patients with active relapsing remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*;177:132-5.
- Akopian** és mtsai., 2007 Transient receptor potential TRPA1 channel desensitization in sensory neurons is agonist dependent and regulated by TRPV1-directed internalization. *J Physiol*; 583:175-93.
- Almulki** és mtsai., 2010 Localization of vascular adhesion protein-1 (VAP-1) in the human eye. *Exp Eye Res.* 90(1):26-32.
- An** és mtsai., 2014 Estrogen rapidly enhances incisional pain of ovariectomized rats primarily through the G protein-coupled estrogen receptor. *Int J Mol Sci*; 15(6):10479-91.
- Andrés** és mtsai., 2001 Tissue activity and cellular localization of human semicarbazide-sensitive amine oxidase. *J Histochem Cytochem*; 49:209-17.
- Autio** és mtsai., 2013 Preclinical evaluation of a radioiodinated fully human antibody for in vivo imaging of vascular adhesion protein-1-positive vasculature in inflammation. *J Nucl Med.*;54(8):1315-9.
- Baraldi** és mtsai., 2010 Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channel as emerging target for novel analgesics and anti-inflammatory agents. *J Med Chem*; 53(14):5085-107.
- Barrière** és mtsai., 2012 Paclitaxel therapy potentiates cold hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic rats through enhanced mitochondrial reactive oxygen species production and TRPA1 sensitization. *Pain*; 153(3):553-61.
- Bautista** és mtsai., 2006 TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell*; 124:1269–82.
- Benemei** és mtsai., 2013 TRPA1 and other TRP channels in migraine. *J Headache Pain*; 14:71.
- Bereiter** és mtsai., 2005 Oestrogen receptor-immunoreactive neurons in the trigeminal sensory system of male and cycling female rats. *Arch Oral Biol*; 50(11):971-9.
- Bessac** és Jordt, 2008 Breathtaking TRP channels: TRPA1 and TRPV1 in airway chemosensation and reflex control. *Physiology (Bethesda)*. 23:360-70.
- Bevan** és mtsai., 1992 Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br. J. Pharmacol.* 107: 544-52.
- Bogdan** és mtsai., 2000 A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol.* 12:64-76.
- Boomsma** és mtsai., 2002 Plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) is an independent prognostic marker for mortality in chronic heart failure. *Eur Heart J*; 21:1859-63.
- Bölskei** és mtsai., 2005 Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain*; 117(3):368-76.
- Cao** és mtsai., 2013 TRPV1 channels are intrinsically heat sensitive and negatively regulated by phosphoinositide lipids. *Neuron*; 77 (4):667–679.
- Cebi** és Koert, 2007 Reactivity recognition by TRPA1 channels. *Chembiochem*; 8(9):979-80.
- Chen** és mtsai., 2004 Competitive inhibition of the capsaicin receptor-mediated current by dehydroepiandrosterone in rat dorsal root ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther*; 311:529–536.
- Chen**, 2015 The evolutionary divergence of TRPA1 channel: heat-sensitive, cold-sensitive and temperature-insensitive. *Temperature*; 2: 158-159.
- Cho** és **Chaban**, 2012 Expression of P2X3 and TRPV1 receptors in primary sensory neurons from estrogen receptors- α and estrogen receptor- β knockout mice. *Neuroreport*; 23(9):530-4.
- Choi** és mtsai., 2014 Are Sensory TRP Channels Biological Alarms for Lipid Peroxidation? *Int. J. Mol. Sci.*; 15(9), 16430-16457.
- Craft**, 2007 Modulation of pain by estrogens. *Pain*; 132 Suppl 1:S3-12.
- DeBerry** és mtsai., 2014 TRPA1 mediates bladder hyperalgesia in a mouse model of cystitis. *Pain*; 155(7):1280-7.
- DeFalco** és mtsai., 2010 Oxime derivatives related to AP18: agonists and antagonists of the TRPA1 receptor. *Bioorg Med Chem*; 20:276–279.
- Dennis** és mtsai., 2009 In vivo effects of a GPR30 antagonist. *Nat Chem Biol*; 5(6):421-7.
- Diogenes** és mtsai., 2006 Prolactin modulates TRPV1 in female rat trigeminal sensory neurons. *J Neurosci*; 26(31):8126-36.

Eberhardt és mtsai., 2012 Methylglyoxal activates nociceptors through transient receptor potential channel A1 (TRPA1): a possible mechanism of metabolic neuropathies. *J. Biol. Chem*; 287: 28291–28306.

Eid és mtsai., 2008 HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. *Mol Pain*; 4:48.

Fillingim és mtsai., 2009 Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings. *J Pain*; 10(5):447-85.

Flake és mtsai., 2005 Estrogen and inflammation increase the excitability of rat temporomandibular joint afferent neurons. *J Neurophysiol*; 93(3):1585-97.

Foot és mtsai., 2013 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*; 347 (2): 365–74.

Frangé és mtsai., 2016 Musculoskeletal pain and the reproductive life stage in women: is there a relationship? *Climacteric*; 19(3):279-84.

Ganderton és mtsai., 2016 Does menopausal hormone therapy, exercise or a combination of both, improve pain and function in post menopausal women with greater trochanteric pain syndrome? *BMC Womens Health*; 16(1):32.

Garpenstrand és mtsai., 1999 Elevated plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) activity in type 2 diabetes mellitus complicated by retinopathy. *Diab Med*;16:514-21.

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

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

Gazerani és mtsai., 2005 A human experimental capsaicin model for trigeminal sensitization. Gender-specific differences. *Pain*; 118(12):155-63.

Geppetti és mtsai., 2008 The concept of neurogenic inflammation. *BJU Int.*;101 Suppl; 3:2-6.

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

Goswami és mtsai., 2011 Oestrogen destabilizes microtubules through an ion-conductivity independent TRPV1 pathway. *J of Neurochemistry*; 117(6):995-1008.

Grace és mtsai., 2014 . Transient receptor potential (TRP) channels in the airway: role in airway disease. *Br J Pharmacol*; 171(10):2593-607.

Helyes és mtsai., 2001 Anti-inflammatory effect of synthetic somatostatin analogues in the rat. *Br J Pharmacol*; 134(7):1571-9.

Helyes és mtsai., 2003 Inhibitory effect of anandamide on resiniferatoxin-induced sensory neuropeptide release in vivo and neuropathic hyperalgesia in the rat.

Helyes és mtsai., 2014 Semicarbazide-sensitive amine-oxidase inhibitors, as analgesics in traumatic neuropathy and neurogenic inflammation.; Hungarian and USA PCT P1400205.

Hiraoka és mtsai., 1988 Inhibition of copper-containing amine oxidase by oximes. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*; 36:3027-31.

Holdcroft és Berkley, 2006 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. Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone:1181-1197.

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

Horváth és mtsai., 2017 Analgesic and Anti-Inflammatory Effects of the Novel Semicarbazide-Sensitive Amine-Oxidase Inhibitor SzV-1287 in Chronic Arthritis Models of the Mouse. *Sci Rep.*; 7:39863.

Hurley és mtsai., 2008 Sex, gender, and pain: an overview of a complex field. *Anesth Analg*; 107(1):309-17.

Jancsó és mtsai., 1967 Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br. J. Pharmacol*; 31: 138-151.

Jarnicki és mtsai., 2016 The inhibitor of semicarbazide-sensitive amine oxidase, PXS-4728A, ameliorates key features of chronic obstructive pulmonary disease in a mouse model. *Br J Pharmacol*; 173(22):3161-3175.

Jeziński és mtsai., 2001 NGF stimulation increases JNK2 phosphorylation and reduces caspase-3 activity in the olfactory bulb of estrogen-replaced animals. *Endocrinology*; 142(6):2401.

Johnston és mtsai., 1996 Hydrogen peroxide induces leukocyte rolling: modulation by endogenous antioxidant mechanism including NO. *Am J Physiol*; 271:H614-621.

Katsura és mtsai., 2006 Antisense knock down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats. *Exp Neurol*; 200:112-23.

Kumar és mtsai., 2015 Contribution of estrogen receptor subtypes, ER α , ER β , and GPER1 in rapid estradiol-mediated enhancement of hippocampal synaptic transmission in mice. *Hippocampus*; 25(12):1556-66.

Kun és mtsai., 2014 Upregulation of the transient receptor potential ankyrin 1 ion channel in the inflamed human and mouse colon and its protective roles. *PLoS One*; 9(9):e108164.

Lacroix-Fralish és mtsai., 2006 Progesterone mediates gonadal hormone differences in tactile and thermal hypersensitivity following L5 nerve root ligation in female rats. *Neuroscience* 2006; 138(2):601-8.

Lin és mtsai., 2008 Serum vascular adhesion protein-1 is higher in subjects with early stages of chronic kidney disease. *Clin Biochem*;41:1362-7.

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

Lu és mtsai., 2009 17 β estradiol rapidly attenuates P2X₃ receptor-mediated peripheral pain signal transduction via ER α and GPR30. *Endocrinology*; 154(7):2421-33.

Lu és mtsai., 2013 17 β estradiol mediates the sex difference in capsaicin-induced nociception in rats. *J Pharmacol Exp Ther*; 331(3):1104-10.

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

Mátyus és Chai, 2016 Metabolism-Activated Multitargeting (MAMUT): An Innovative Multitargeting Approach to Drug Design and Development. *ChemMedChem*; 11(12):1197-8.

Mátyus és mtsai., 2010 Metabolism-Activated Multitargeting (MAMUT): An Innovative Multitargeting Approach to Drug Design and Development. *ChemMedChem*; 11(12):1197-8.

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

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

Moparthi és mtsai., 2014. Human TRPA1 is intrinsically cold- and chemosensitive with and without its N-terminal ankyrin repeat domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 111(47):16901-6.

Németh és mtsai., 1998 Development of a new sensitive CGRP radioimmunoassay for neuropharmacological research. *Neurobiol*; 6(4):473-5.

Nilius és mtsai., 2012 The transient receptor potential channel TRPA1: from gene to pathophysiology. *Pflugers Arch*; 464(5):425-58.

Nilius és Szállási, 2014 A. Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. *Pharmacol Rev*; 66(3):676-814.

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

Perner és mtsai., 2009 (Heteroaryl)alkenone Oxime Derivatives as TRPA1 Antagonists Useful in the Treatment of Various Diseases.; WO 2009089083.

Petrus és mtsai., 2007 A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. *Mol Pain*; 3:40.

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

Pohóczky és mtsai., 2016 Estrogen dependent up-regulation of TRPA1 and TRPV1 receptor proteins in the rat endometrium. *J Mol Endocrinol*; 56(2):135-49.

Pozsgai és mtsai., 2016 Analgesic effect of dimethyl trisulfide in mice is mediated by TRPA1 and sst4 receptors. *Nitric Oxide*; 65:10-21.

Puri és mtsai., 2011 Estrogen in cycling rats alters gene expression in the temporomandibular joint, trigeminal ganglia and trigeminal subnucleus caudalis/upper cervical cord junction. *J Cell Physiol*; 226(12):3169-80.

Remadevia és Szallasi, 2008 Adlea (ALGRX-4975), an injectable capsaicin (TRPV1 receptor agonist) formulation for longlasting pain relief. *IDrugs*; 11(2):120-32.

Riley és mtsai., 1998 Orofacial pain symptom prevalence: selective sex differences in the elderly? *Pain*; 76(1-2):97-104.

- Ruau** és mtsai., 2012 Sex differences in reported pain across 11,000 patients captured in electronic medical records. *J Pain*; 13(3):228-34.
- Sághy** és mtsai., 2015 Evidence for the role of lipid rafts and sphingomyelin in Ca²⁺-gating of Transient Receptor Potential channels in trigeminal sensory neurons and peripheral nerve terminals. *Pharmacol. Res*; 100: 101-116.
- Salat** és mtsai., 2014 Zucapsaicin for the treatment of neuropathic pain. *Expert Opin Investig Drugs*; 23(10):1433-40.
- Salter-Cid** és mtsai., 2005 Anti-inflammatory effects of inhibiting the amine oxidase activity of semicarbazide-sensitive amine oxidase. *J Pharmacol Exp Ther*; 315(2):553-62.
- Sándor** és mtsai., 2005 Construction of a stable cell line uniformly expressing the rat TRPV1 receptor. *Cell. Mol. Biol. Lett*; 10: 499-514.
- Smith** és mtsai., 1998 . Cloning of vascular adhesion protein 1 reveals a novel multifunctional adhesion molecule. *J Exp Med*; 188(1):17–27.
- Stolen** és mtsai., 2005 Absence of the endothelial oxidase AOC3 leads to abnormal leukocyte traffic in vivo. *Immunity*; 22:105-15.
- Story** és mtsai., 2003 ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*; 112(6):819-29.
- Szállási és Blumberg**. Specific binding of resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog, by dorsal root ganglion membranes. *Brain. Res.* 1990; 524: 106-111.
- Szolcsányi** 2008 Hot target on nociceptors: perspectives, caveats and unique features. *Br J Pharmacol*; 55(8):1142–44.
- Szolcsányi**, 1996 Neurogenic inflammation: reevaluation of axon reflex theory. In: P. Gepetti and P.Holzer (Eds.) *Neurogenic Inflammation*. CRC Press, Boca Raton; pp. 33-42.
- Szöke** és mtsai., 2000 Interacting effects of capsaicin and anandamide on intracellular calcium in sensory neurons. *Neuroreport*; 11:1949–1952.
- Szöke** és mtsai., 2010 Effect of lipid raft disruption on TRPV1 receptor activation of trigeminal sensory neurons and transfected cell line. *Eur J Pharmacol*; 628(1-3):67-74.
- Tábi** és mtsai., 2013 Study on SSAO enzyme activity and anti-inflammatory effect of SSAO inhibitors in animal model of inflammation. *J Neural Transm (Vienna)*; 120(6):963-7.
- Takanami** és mtsai., 2010 Expression of G protein-coupled receptor 30 in the spinal somatosensory system. *Brain Res*; 1310:17-28.
- Tominaga** és mtsai., 1998 Raumann B.E., Basbaum A.I., Julius D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*. 1998; 21: 531-543.
- Treen** és mtsai., 2016 Divergent Regulation of ER and Kiss Genes by 17β-Estradiol in Hypothalamic ARC Versus AVPV Models. *Mol Endocrinol*; 30(2):217-33.
- Valente** és mtsai., 2012 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*; 90(10):1989-96.
- Walker** és mtsai., 2003 The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther*; 304, 56–62.
- Wallace** és Pappagallo, 2011 Qutenza®: a capsaicin 8% patch for the management of postherpetic neuralgia. *Expert Rev Neurother*; 11(1):15-27.
- Wang** és mtsai., 2006 Design, synthesis, and biological evaluation of semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) inhibitors with anti-inflammatory activity. *J Med Chem*; 49(7):2166-73.
- Welch** és mtsai., 2000 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*; 97:13889–13894.
- Wu** és mtsai., 2010 17-Beta-estradiol enhanced allodynia of inflammatory temporomandibular joint through upregulation of hippocampal TRPV1 in ovariectomized rats. *J Neurosci*; 30(26):8710-9.
- Yu** és mtsai, 2003 Physiological and pathological implications of semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Biochim Biophys Acta*; 1647:193-9.
- Zhang** és mtsai., 2005 NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *The EMBO Journal*; 24:4211–4223.
- Zurborg** és mtsai., 2007 Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺, *Nat Neurosci*, vol. 10, (3), pp. 277–9.

X. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

Payrits M, Sággy 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, Sággy É, Szolcsányi J, Pohóczky K, Csekő K, Bölskei 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

XI. EGYÉB EREDETI PUBLIKÁCIÓK

Sággy 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 Ca²⁺-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

Sággy É, **Payrits M**, Helyes Z, Reglödi 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, Sággy É, **Payrits M**, Kajtár B, Kovács K, Környei JL, Garai J, Garami A, Perkecz A, Czeglédi L, Helyes Z. (2016). *Estrogen-dependent up-regulation 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, Sággy É, **Payrits M**, Aubdool AA, Szőke É, Pozsgai G, Bártai IZ, Nagy L, Filotás D, Helyes Z, Brain SD, Pintér E. (2016). *Capsaicin-sensitive sensory nerves mediate the cellular and microvascular effects of H₂S 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**, Sággy É, Sebestyén-Bártai 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

Bölskei K, Kriszta G, Sággy É, **Payrits M**, Sipos É, Vranesics A, Berente Z, Ábrahám H, Ács P, Komoly S, Pintér E (2018). *Behavioural alterations and morphological changes are attenuated by the lack of TRPA1 receptors in the cuprizone-induced demyelination model in mice.* Journal of Neuroimmunology (2018.03.26-án elfogadva) IF:2,720

Összesített impact faktor: **28,859**

Összes független citáció: **21**

XII. ELSŐ SZERZŐS KONGRESSZUSI POSZTER PREZENTÁCIÓK ÉS ELŐADÁSOK

M. Payrits, É. Szőke, É. Sággy, 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.

Payrits M., Sággy 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.

M. Payrits, É. Szőke, É. Sággy, 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.

Payrits M., Sággy 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.

Payrits M., Sággy 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/Szentágotthai János Kutatóközpont PhD és TDK konferencia, Pécs. előadás

M. Payrits, É. Sággy, P. Mátyus, A. Czompa, R. Ludmerczki, R. Deme, Zs. Helyes, É. Szőke: *Egy új oxim vegyület antagonistá hatásának jellemzése Tranziens Receptor Potenciál ioncsatornákon.* A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság Experimentális Farmakológiai szekciójának IX. szimpoziuma, Velence.

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

M. Payrits, É. Szőke, Zs. Helyes, I.M. Ábrahám, E. Pintér: *The role of Transient Receptor Potential Ankyrin1 receptors in β -amyloid₁₋₄₂-induced cholinergic neurodegeneration in the basal forebrain.* Neuropeptides 2015. Skócia, Aberdeen. P12.

M. Payrits, É. Szőke, Zs. Helyes, I.M. Ábrahám, E. Pintér: *The role of Transient Receptor Potential Ankyrin1 receptor in β -amyloid₁₋₄₂-induced Alzheimer's disease.* IBRO, Budapest.

Payrits M., Sággy É., Szolcsányi J., Pohóczky K., Csekő K., Bölcskei K., Ernszt D., Barabás K., Ábrahám I., Helyes Zs., Szőke É. *Evidence for the role of estradiol 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

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.

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

Payrits M, Borbély É, Szőke É, Helyes Zs, Barabás K, Ábrahám IM, Pintér E. *The role of Transient Receptor Potential Ankyrin1 Receptor in B-amyloid₁₋₄₂-induced Alzheimer's disease*. 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

XIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Szőke Évának a PhD-s éveim során nyújtott rengeteg segítségét, iránymutatását és biztató 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. Köszönetet 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, Dr. Pohóczky Krisztinának, Bencze Noéminek, Dr. Aczél Tímeának, Dr. Horváth Ádámnak, Dr. Hunyady Ágnesnek, Dr. Batai 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 és Godó Somának 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 segítettek a munkámat. Köszönet Dr. Sándor Zoltánnak a TRPV1 és TRPA1 receptor-expresszálo sejt vonal létrehozásáért.

Hálás vagyok a kísérletekben nyújtott nélkülözhetetlen segítségért Disztl Cecéliának, Ömböli Gyuláné Dórinak, Bagoly Teréznek, Sabáliné Udvarácz Ildikónak, Búzasi Ádámné Annának, Szentes Nikolettnek, Hírné Perkecz Anikónak, Zöldhegyi Józsefné Marának, Harsányi Zsófiának és Draskóczy 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, Ernszt Dávidnak azt a rengeteg támogatást, ami lehetővé tette, hogy ez a dolgozat megszülessen.