

**TRANZIENS RECEPTOR POTENCIÁL ÉS HIPOFÍZIS
ADENILÁT-CIKLÁZ AKTIVÁLÓ POLIPEPTID RECEPTOROK
AKTIVÁCIÓS ÉS GÁTLÓ MECHANIZMUSAINAK VIZSGÁLATA
IN VITRO RENDSZEREKBEN**

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS



dr. Sággy Éva

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Neurofarmakológiai Program

Doktori Iskola vezetője, Programvezető: Prof. Dr. Pintér Erika

Témavezető: Dr. Szőke Éva

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Pécs

2016

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2. KUTATÁSI KONCEPCIÓ	7
3. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	10
3.1 A lipid raft diszrupció hatása a TRP receptorok aktiválhatóságára	10
3.1.1 A kapszaicin története.....	10
3.1.2 A TRP receptorok	11
3.1.3 A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződés.....	18
3.1.4 A lipid raft modell.....	19
3.1.5 A lipid raftok funkciói	21
3.1.6 A lipid raftok farmakológiai vizsgálata	21
3.2 A hidrogén-szulfid donor vegyületek és a DMTS target molekulájának azonosítása	22
3.2.1 A hidrogén-szulfid és a poliszulfidok szintézise, metabolizmusa	22
3.2.2 A hidrogén-szulfid és a poliszulfidok élettani hatásai	23
3.2.3 A hidrogén-szulfid és a poliszulfidok molekuláris célpontjai	24
3.3 A PACAP receptor agonisták és antagonisták hatásának vizsgálata	26
3.3.1 A PACAP előfordulása szervezetben és élettani hatásai	26
3.3.2 A PACAP receptorok.....	27
3.3.3 A PACAP receptor agonisták és antagonisták.....	29
3.3.4 A PACAP szerepe migrénben.....	31
4. CÉLKITŰZÉSEK	32
5. KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK	33
5.1 Primer sejtenyészet és sejtvonalak.....	33
5.1.1 Patkány és egér trigeminális ganglionsejt tenyészet.....	33
5.1.2 TRPV1, TRPA1, PACAP receptor-expresszáló sejtvonalak.....	33
5.2 Vizsgálati módszerek	33
5.2.1 Intracelluláris Ca^{2+} koncentráció mérés fluoreszcens módszerrel.....	33

5.2.2	Radioaktív $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvétel vizsgálatok sejtvonalakon	36
5.2.3	[^{35}S] Guanozin-5'-O-[γ -tio] trifoszfát ([^{35}S]GTP γ S) kötődési teszt	36
5.2.4	Patch-clamp módszer	37
5.2.5	CGRP felszabadulás mérése radioimmunoassay (RIA) módszerrel izolált patkány trachea érzőideg-végződéseiből	39
5.2.6	Fluoreszcencia spektroszkópia	40
5.2.7	Filipin fluoreszcens jelölés	42
5.3	Anyagok	43
5.4	Statisztikai analízis	44
5.5	Etikai vonatkozások	44
6.	EREDMÉNYEK	45
6.1	A lipid raft diszrupció hatása a TRP receptorok aktiválhatóságára	45
6.1.1	Szfingomielináz kezelés hatása a TRP receptorok működésére TRG neuronokon	45
6.1.2	Szfingomielináz kezelés hatása a feszültségfüggő kalcium csatornák működésére és a belső membránok szerkezeti integritására TRG neuronokon	49
6.1.3	Ceramid és szfingozin kezelés hatása a TRP receptorok működésére TRG neuronokon és TRPV1 receptor-expresszáló CHO sejteken	50
6.1.4	Szfingomielináz, ceramid és szfingozin kezelés hatása a TRP receptorok működésére perifériás érzőideg-végződéseken	51
6.1.5	MCD kezelés hatása a TRP receptorok működésére TRG neuronokon ...	53
6.1.6	Myriocin kezelés hatása a TRP receptorok működésére TRG neuronokon	56
6.1.7	MCD kezelés hatása a plazmamembrán rendezett és rendezetlen fázisainak arányára	58
6.1.8	MCD kezelés koleszterin depletáló hatásának kimutatása	59
6.1.9	Összefoglalás	60
6.2	A hidrogén-szulfid donor vegyületek és a DMTS target molekulájának azonosítása	60

6.2.1	A hidrogén-szulfid donor vegyületek (Na ₂ S, NaHS) target molekulájának azonosítása TRG neuronokon.....	60
6.2.2	A DMTS target molekulájának azonosítása TRG neuronokon	62
6.2.3	A DMTS hatása a TRPA1 áramokra TRPA1 receptor-expresszáló CHO sejteken	63
6.3	A PACAP receptor agonisták és antagonisták hatásának vizsgálata	65
6.3.1	A PACAP receptor agonisták és antagonisták hatása TRG neuronokon..	65
6.3.2	A PACAP receptor agonisták és antagonisták hatása PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptor-expresszáló sejt vonalakon	69
6.3.3	Radioaktív ⁴⁵ Ca ²⁺ felvétel vizsgálatok TRPV1, PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptor-expresszáló sejt vonalakon.....	71
6.3.4	Összefoglalás	72
7.	MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK	73
7.1	A lipid raft diszrupció hatása a TRP receptorok aktiválhatóságára	73
7.2	A hidrogén-szulfid donor vegyületek és a DMTS target molekulájának azonosítása	75
7.3	A PACAP receptor agonisták és antagonisták hatásának vizsgálata	76
8.	ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	80
9.	IRODALMI HIVATKOZÁSOK	82
10.	PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK.....	96
10.1	Az értekezés alapját képező publikációk.....	96
10.2	Egyéb eredeti publikációk.....	96
10.3	Idézhető absztraktok	97
10.4	Kongresszusi poszter prezentációk	98
10.5	Kongresszusi szóbeli előadások	101
11.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	102

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

[³⁵ S]GTP γ S:	[³⁵ S]guanozin-5'-O-[γ -tio]trifoszfát
[Ca ²⁺] _i :	intracelluláris Ca ²⁺ koncentráció
3-MST:	3-merkaptopiruvát-szulfurtranszferáz
AITC:	allilizotiocianát
ANOVA:	analysis of variance/variancia-analízis
CaM:	kalcium-kalmodulin
cAMP:	ciklikus adenzin-monofoszfát
CBS:	cisztationin- β -szintáz
CGRP:	calcitonin gene-related peptide/kalcitonin gén-rokon peptid
α -CGRP ^{+/+} egér:	α -kalcitonin gén-rokon peptid vad típusú egér
α -CGRP ^{-/-} egér:	α -kalcitonin gén-rokon peptid génhiányos egér
CHO:	chinese hamster ovary/kínai hörcsög ovárium
CO:	szén-monoxid
COX:	ciklooxigenáz
CPM:	count per minute/percenkénti beütésszám
CSE:	cisztationin- γ -liáz
DAG:	diacilglicerol
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DPP IV:	dipeptidil-peptidáz IV
DRG:	dorsal root ganglion/hátsógyöki ganglion
EGTA:	ethylene-glycol-tetraacetic acid/ etilén-glikol-tetraecetsav
ER:	endoplazmatikus retikulum
fura-2 AM:	fura-2 acetoxi-metilészter
GDP:	guanozin-5'-difoszfát
GP:	generalised polarisation/általános polarizáció
GPI:	glikozil-foszfatidil-inozitol
IP ₃ :	inozitol-triszfoszfát
LPA:	lysophosphatidic acid/ lizofoszfatidsav
M65:	maxadilan 65
MAPK:	mitogén-aktivált protein kináz
MCD:	metil- β -ciklodextrin
NGF:	nerve growth factor/idegi növekedési faktor
NF κ B:	nukleáris faktor κ B

NK ₁ :	neurokinin 1
NK1 ^{+/+} egér:	neurokinin 1 receptor vad típusú egér
NK1 ^{-/-} egér:	neurokinin 1 receptor génhiányos egér
NKA:	neurokinin A
NMDG:	N-metil-D-glukamin
NO:	nitrogén-monoxid
NSAID:	non-steroidal anti-inflammatory drugs/ nem-szteroid gyulladásgátlók
PACAP:	pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide/ <i>hypohysis</i> adenilát-cikláz aktiváló polipeptid
PACAP ^{-/-} egér:	<i>hypohysis</i> adenilát-cikláz aktiváló polipeptid génhiányos egér
PBS:	phosphate buffer saline/foszfát puffer oldat
PC:	foszfatidil-kolin
PIP ₂ :	foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát
PKA:	protein kináz A
PKC:	protein kináz C
PLC:	foszfolipáz C
PLD:	foszfolipáz D
PS:	pregnenolon-szulfát
RAMP:	receptor aktivációt módosító protein
RIA:	radioimmunoassay
ROS:	reactive oxygen species/reaktív oxigén gyök
RTX:	reziniferatoxin
SDS:	sodium-dodecil-sulfate/nátrium-dodecil-szulfát
SMáz:	szfingomielináz
SP:	substance P/P-anyag
sst:	szomatosztatin
sst ₄ ^{+/+} egér:	szomatosztatin 4 receptor vad típusú egér
sst ₄ ^{-/-} egér:	szomatosztatin 4 receptor génhiányos egér
TNC:	trigeminus nucleus caudalis/ <i>nucleus caudalis nervi trigemini</i>
TRG:	trigeminális ganglion
Tris-EGTA:	tris-ethylene-glycol-tetraacetic acid/ trisz-etilén-glikol-tetraecetsav
Tris-HCl:	tris-(hydroxymethyl)-aminomethane-hydrochloride/ trisz-(hidroximetil)-aminometán-hidroklorid

TRP:	Tranziens Receptor Potenciál
TRPA1:	Tranziens Receptor Potenciál Ankirin 1
TRPA1 ^{+/+} egér:	Tranziens Receptor Potenciál Ankirin 1 receptor vad típusú egér
TRPA1 ^{-/-} egér:	Tranziens Receptor Potenciál Ankirin 1 receptor génhiányos egér
TRPM3:	Tranziens Receptor Potenciál Melasztatin 3
TRPM8:	Tranziens Receptor Potenciál Melasztatin 8
TRPV1:	Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1
VIP:	vazoaktív intesztinális polipeptid
VR1:	Vanilloid 1

2. KUTATÁSI KONCEPCIÓ

A fájdalom tényleges vagy potenciális szövetkárosodást jelző, kellemetlen és szubjektív érzéskvalitás, jelentős emocionális komponenssel. A nociceptorok potenciálisan szövetkárosító ingerekre (termális, mechanikai, kémiai) specifikusan reagáló szenzoros idegvégződés, fájdalomsignált közvetítenek a központi idegrendszerbe. A nociceptorok felosztása több szempont szerint történhet. Érzékenységük alapján megkülönböztetünk csak egyfajta ingerrel aktiválható unimodális, illetve többféle ingerrel egyaránt aktiválható polimodális nociceptorokat. Axonjaik mielinizáltsága szerint léteznek vékonyan mielinizált, közepesen nagy átmérőjű A_δ rostok, melyek a gyorsan terjedő (12–30 m/s), éles, magas ingerküszöbű, primer (szomatikus) fájdalomért felelősek. A nociceptorok másik nagy csoportja a kis átmérőjű, mielinhiányos nélküli, lassan vezető (0,5–2,0 m/s) C-rostok, melyek a szekunder, diffúz típusú fájdalomért felelősek. A felszálló nociceptív pálya első eleme a nociceptív primer afferens neuron (I. neuron), melynek centrális nyúlványa szinaptizál a hátsó szarv I., II. és V. rétegének projekciós neuronjaival. Kétféle felszálló projekciós neuron (II. neuron) szállítja az információt a hátsó szarvtól a *thalamus*-ig (*spinothalamicus* pálya), ahol a fájdalom-bemenet integrációja megy végbe. Az átkapcsolódás után a rostok egy része a kéreg felé halad, más részük ágakat ad le a *putamen*, a *nucleus caudatus* és a *pallidum* felé (*subcorticalis* fájdalom-pálya). A III. neuron a *thalamus*-ból a szenzoros kéregbe vezet (*thalamocorticalis* pálya). A csípős paprikában található kapszaicin a perifériás nociceptorok egy speciális típusán, az ún. kapszaicin-érzékeny peptiderg afferenseken lokalizálódó Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1 (TRPV1) receptoron fejt ki a hatását. A TRPV1 receptort expresszáló neuronok 30%-a tartalmazza a Tranziens Receptor Potenciál Ankirin 1 (TRPA1) receptort (Story és mtsai., 2003). A TRPV1 receptor farmakológiai vizsgálatának legfontosabb eszköze a kapszaicin mellett a reziniferatoxin (RTX), mely exogén vanilloid struktúrájú ultrapotens kapszaicin analóg. A TRPA1 receptor fontos exogén agonistája az allilizotiocianát (AITC), újabb kutatások szerint a hidrogén-szulfid (H_2S) is képes aktiválni a receptort. A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végzések jellegzetessége, hogy hármas funkcióval rendelkeznek: afferens, lokális és szisztémás efferens működéseket közvetítenek. Számos betegség patomechanizmusában fontos szerepet játszó neurogén gyulladást a jelenleg rendelkezésre álló gyógyszeres terápia nem képes hatékonyan befolyásolni. Az opioidok nagy hatékonyságú és hatásereőségű analgetikumok, fájdalomcsillapító hatásukban szerepet játszik a leszálló gátlópályák aktiválása, valamint gerincvelői hatások

(preszinaptikusan: mediátor felszabadulás gátlása, posztoszínaptikusan: membrán hiperpolarizáció). Alkalmazásukat korlátozzák súlyos mellékhatásaik, mint a légzőközpont-depresszió és a kezelés során kialakuló opioid-dependencia jelensége. A széles körben alkalmazott nem-szteroid gyulladásgátlók (NSAID) a fájdalom- és gyulladások keltő prosztaglandinokat szintetizáló ciklooxygenáz (COX) enzimet gátolják. Az opioidokkal ellentétben nem okoznak dependenciát, azonban kisebb hatékonysággal rendelkeznek, valamint gasztrointesztinális, renális és hematológiai mellékhatásokat okoznak. A mellékhatások mérséklése céljából kifejlesztett COX-2 preferenciális szerek azonban a nem-szelektív szerekhez hasonlóan a kardiovaszkuláris rizikót jelentősen növelik. Az adjuváns analgetikumok (triciklikus antidepresszánsok, antiepileptikumok, helyi érzéstelenítők) a neuropátiás fájdalmat csökkentik, általános analgetikus hatással azonban nem rendelkeznek. Mindezek alapján szükséges új hatásmechanizmusú, elsősorban az érzőideg-végződéseken ható fájdalomcsillapítók, gyulladáscsökkentők fejlesztése. A H₂S képes aktiválni a kapszaicin-érzékeny peptiderg érzőideg-végződéseket, ezáltal szerepe lehet gyulladás- és fájdalomfolyamatokban. Számos modellrendszerben bizonyították, hogy a gázmediátor ezt a hatást TRPA1 receptoron keresztül fejti ki. A TRPV1 receptort a fájdalom farmakológiai befolyásolhatóságának fő target molekulájának tartják, az antagonisták és az agonisták is analgetikus hatással bírnak. A TRPV1 antagonisták alkalmazhatóságát azonban korlátozzák súlyos mellékhatásaik (hipertermia, hőérzékelési zavar). Alternatív alapkísérletes megközelítése lehet a receptorműködés befolyásolásának a receptorok hidrofób kapcsolatainak vizsgálata. A TRP receptorok számos tagja képez jelátviteli komplexet az ún. lipid raftokban, melyek szerkezeti integritása hatással van a receptorok működésére. A migrén patomechanizmusának legelfogadottabb elmélete a trigeminovaskuláris teória (Moskowitz, 1992). A trigeminovaskuláris rendszert a primer szenzoros pszeudounipoláris neuronok és a meningeális erek alkotják. Az érzőneuron perifériás ágai a kraniális ereket és a meningeális szöveteket innerválják, a sejttestek a trigeminális ganglionban (TRG) találhatóak. A centrális rostok az agytörzsben, a *nucleus caudalis nervi trigemini*-ben (TNC) és a *nucleus tractus spinalis nervi trigemini*-ben található másodrendű neuronok területére projektálnak. A harmadrendű neuron a *thalamus*-ban lokalizálódik. A migrén generátorként azonosított raphe magból, *periaqueductalis* szürkeállományból és *locus coeruleus*-ból kiinduló leszálló pályák szerepet játszanak a trigeminovaskuláris aktivációban. Az aktiváció következtében vazóaktív neuropeptidek, mint a kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP), P-anyag (SP) és vazóaktív intesztinális polipeptid (VIP) szabadulnak fel a végződésből, melyek értágulatot, plazmaprotein

kiáramlást, hízósejt degranulációt okoznak, kialakítva a neurogén gyulladást. A peptiderg szenzoros idegvégződéseken expresszálódnak az 5-HT_{1B/D} receptorok, melyeknek agonistái a triptánok migrénes roham kezelésére alkalmazott szerek. Hatékonyan gátolják a szenzoros neuropeptidek felszabadulását, a meningeális ereken vazokonstriktor hatásúak, azonban nem képesek hatékonyan csökkenteni a trigeminális hiperexcitabilitást (Villalón és mtsai., 2003). A profilaktikus kezelés (β -blokkolók, 5-HT₂ antagonisták, triciklikus antidepresszánsok) csak a betegek egy részénél képes a rohamokat kialakulását gátolni. A migrén patomechanizmusának további tanulmányozása, új targetek azonosítása egy hatékonyabb, sikerebb migrénellenes terápia szempontjából elengedhetetlen. A PACAP a trigeminovaskuláris rendszerrel összefüggő régiókban expresszálódik (Tajti és mtsai., 2001). Újabb kutatások szerint a PACAP migrénszerű fejfájást generál (Schytz és mtsai., 2009). Egy másik humán megfigyelés szerint migrénes rohamok alatt a PACAP plazmakoncentrációja megemelkedett (Tuka és mtsai., 2013). Kutatócsoportunk PACAP génhiányos egerek felhasználásával végzett komplex magatartási, funkcionális és morfológiai vizsgálatai bizonyítják, hogy a PACAP jelentős szerepet játszik a trigeminovaskuláris rendszer aktivációjában. A neuropeptid közvetlenül a meningeális ereken, a TRG és a TNC szintjén fejt ki aktiváló hatását (Markovics és mtsai., 2012). Ezen megfigyelések alapján a PACAP receptorok új potenciális terápiás célpontok lehetnek migrénellenes gyógyszerfejlesztés folyamán.

3. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 A lipid raft diszrupció hatása a TRP receptorok aktiválhatóságára

3.1.1 A kapszaicin története

A nociceptív primer afferens neuronok vizsgálatában fontos szerepe van a paprikában (*Capsicum annuum*) előforduló vegyületnek, a kapszaicinnek (8-metil-N-vanillil-6-nonénamid). A kapszaicin elnevezés Thresh-től származik, aki 1846-ben izolálta és feltételezte, hogy struktúrája a vanillinhez hasonló (Thresh, 1846). Pontos szerkezetét 1919-ben azonosították (Nelson, 1919), szintézisét 1930-ban írták le (Spath és Darling, 1930). A magyar kutatók fontos szerepet töltek be a kapszaicin kutatásban. Az első jelentős megfigyelés Hőgyes Endre nevéhez fűződik, aki a kapszaicin hatásainak tanulmányozása során megállapította, hogy elsősorban érzőidegekre hat (Hőgyes, 1878). Különösen nagy jelentőséggel bírt Jancsó Miklós megfigyelése, mely szerint a kapszaicin nagy dózisa következtében kémiai fájdalomkeltő anyagokkal szemben deszenzibilizáció alakul ki (Jancsó, 1960). A kapszaicin-érzékeny nociceptorok ortodrómos vagy antidrómos stimulációja a beidegzés területén vazodilatációt és plazma extravazációt váltott ki, mely folyamat kialakulását denerváció, illetve kapszaicinnal történő deszenzibilizáció egyaránt gátolta. A kísérletsorozatból arra a következtetésre jutottak, hogy a gyulladáskeltő mediátorok a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégződésekből szabadulnak fel (Jancsó és mtsai., 1967, 1968).

Nagy jelentősége volt Szolcsányi János és Jancsó Gábor Aranka szerkezet-hatás vizsgálatainak, mely alapján elsőként vetették fel a kapszaicin receptor létezését (Szolcsányi és Jancsó Gábor, 1975; 1976). Több mint egy évtizeddel később spinális hátsógyöki neuronok membránjában specifikus RTX kötőhelyeket azonosítottak (Szállási és Blumberg, 1990), valamint kapszaicin analógokat kötő fehérjéket is leírtak (James és mtsai., 1988; Wood és mtsai., 1990). 1992-ben szintetizálták az első kompetitív antagonistát a kapszazepint (Bevan és mtsai., 1992), mellyel lehetővé vált a kapszaicin receptor élettani szerepének felderítése. Fontos mérföldkövét jelentette a kapszaicin kutatásnak a kapszaicin receptor klónozása (Caterina és mtsai., 1997). A receptor a Vanilloid 1 (VR1) nevet kapta, mivel a kapszaicin mellett számos egyéb vanilloid szerkezeti elemet tartalmazó vegyület is aktiválja a receptort. Később a kapszaicin receptort szerkezete alapján a TRP családba és ismert ligandjának struktúrája szerint a Vanilloid alcsaládba sorolták, így a TRPV1 elnevezést kapta (Gunthorpe és mtsai., 2002).

3.1.2 A TRP receptorok

A Transiens Receptor Potenciál (TRP) receptorok számos szövetben és sejttípusban expresszáló nem-szelektív kationcsatornák (Pedersen és mtsai., 2005). A szekvencia és szerkezeti homológia alapján 6 alcsaládot különböztetünk meg: TRPV (Vanilloid), TRPM (Melasztatin), TRPP (Policisztin), TRPML (Mukolipin), TRPA (Ankirin), TRPC (Kanonikus/Klasszikus), TRPN (NOMPC-szerű). A TRPN család tagjai emlősökben nem fordulnak elő. Emlősökben 28 TRP csatornát azonosítottak (27 humán), melyek közül 10 mutat hőmérséklet-szenzitivitást: TRPV1-4, TRPA1, TRPM2, TRPM3, TRPM4, TRPM5, TRPM8 (Irving és mtsai., 2011). A TRP receptorok számos strukturális hasonlóságot mutatnak. Szerkezetükre jellemző, hogy 6 transzmembrán domént (S1-S6) tartalmaznak, az 5. (S5) és 6. (S6) domén közötti hurok hozza létre a csatorna pórusát. A receptorok homo- vagy heterotetramer formában alkotnak funkcionális csatornát, illetve mind az N-, mind a C-terminális intracellulárisan helyezkedik el (Gaudet, 2008). A TRP receptorok polimodálisak, fizikai (feszültség, hőmérséklet, mechanikai ingerek) és kémiai (endogén, exogén) ingerek széles skálája aktivációhoz vezet. (Nieto-Posadas és mtsai., 2011).

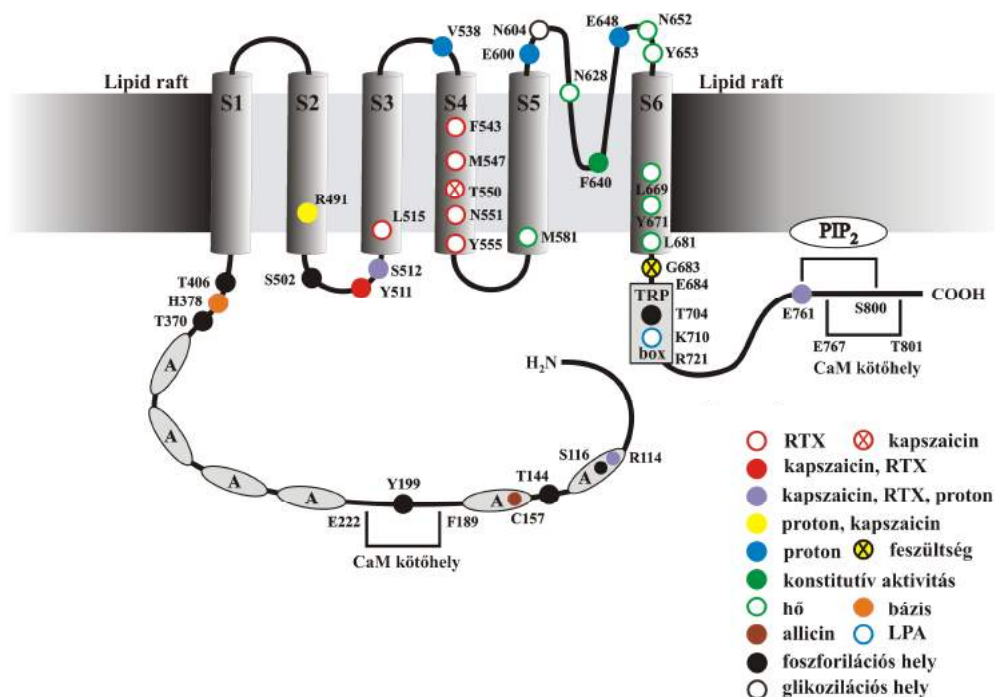
Dolgozatom fókuszában a hőmérséklet-érzékeny TRP receptorok, az ún. „termo TRP receptorok” álltak, melyek célpontjai lehetnek új típusú fájdalomcsillapító, gyulladáscsökkentő hatóanyagok fejlesztésének.

TRPV1 receptor

A TRPV1 receptor nem-szelektív kationcsatorna, relatív permeabilitása: $P_{Ca}/P_{Na}=10$ (Caterina és mtsai., 2001). A patkány TRPV1 receptor 92%-os egyezést mutat a később klónozott humán receptor szerkezetével (McIntyre és mtsai., 2001). A kapszaicin mellett számos növényi eredetű vanilloid struktúrájú vegyület (RTX, piperin, zingeron, eugenol) képes aktiválni a receptort. Az RTX a kapszaicin ultrapotens analógjának tekinthető (Blumberg és mtsai., 1993; Szállási és Blumberg, 1990; 1999). Újabb kutatások azt a feltételezést támasztják alá, hogy a kapszaicin és az RTX nem két külön receptoron hatnak, hanem a receptor molekulán belül alloszterikus kötőhelyek léteznek a két agonista számára. Az exogén aktivátorok mellett endokannabinoidok, mint az anandamid (Zygmunt és mtsai., 1999) és az N-arachidonoil-dopamin, valamint a nem-kannabinoid endogén lipofil vegyület az N-oleoildopamin (Chu és mtsai. 2003) is TRPV1 agonista. Emellett a 12-S-hidroperoxieikozatetraénsav, a leukotrién B₄, a 9-hidroxioktadekadiénsav és a lizofoszfátidsav is nyitják az ioncsatornát. A resolvin D₂ és

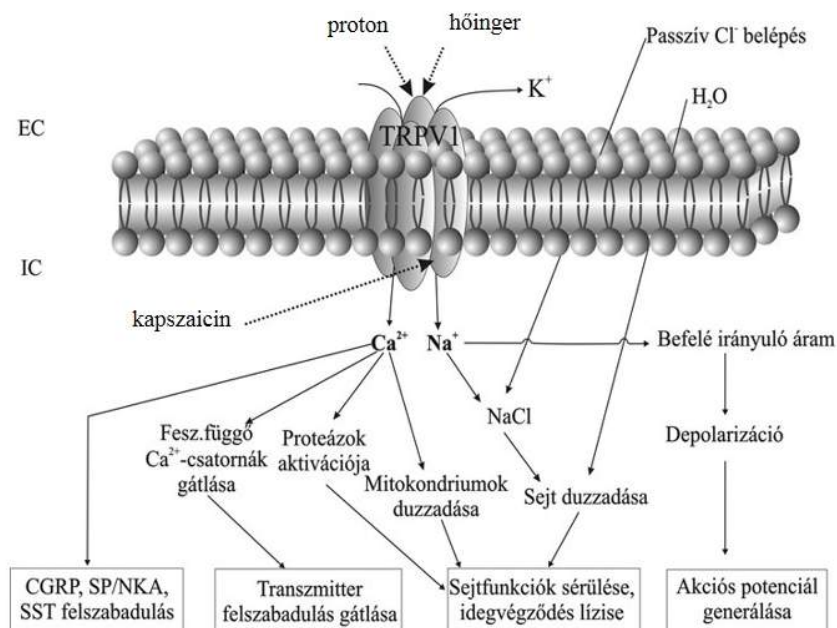
a resolvin E₁ potens endogén lipofil TRPV1 antagonisták (Morales-Lázaro és mtsai., 2013). A fájdalmas hőinger (> 43 °C) (Tominaga és mtsai., 1998) és az alacsony pH (< 6) (Nilius, 2007) is receptor aktivációt vált ki. Gyulladás-keltő mediátorok, mint bradikinin, prosztaglandinok, tumor nekrosis faktor α , idegi növekedési faktor (NGF) szenzitizálják a receptort. A bradikinin és a prosztaglandinok G-protein-kapcsolt receptorokon, míg az NGF tirozin kináz A receptoron keresztül intracelluláris jelátviteli utak aktiválásával foszforiláció-indukált szenzitizációt okoznak (Szolcsányi és Sándor 2012).

A TRPV1 receptoron számos kötőhelyet azonosítottak, a receptor funkcionálisan fontos régióit az 1. ábra szemlélteti. Az S3 és S4 transzmembrán régiókban és az ezeket összekötő hurokrégióban mutattak ki ligandumkötésben szerepet játszó aminosav oldalláncokat (Jordt és Julius, 2002). A vanilloid kötőhely az intracelluláris oldalon található, a kapszaicin és a vanilloid csoportot tartalmazó agonisták az ún. vanilloid zsebhez kötődnek, melyet az S3 és S4 transzmembrán domének alakítanak ki (Papakosta és mtsai., 2011). A protonok általi, a csatorna nyitását eredményező konformációváltozásban a pórusformáló régiót összekötő extracelluláris huroknak van jelentősége (Jordt és mtsai., 2000). A pórusrégiót alkotó kritikus aminosavak felelősek mind a protonok, mind a hőinger által kiváltott aktivációért. Hőérzékelés szempontjából fontos régiók a receptormolekulán belül az N628K, N652T, Y653T aminosavak, melyek mutációja rövidebb nyitási időt eredményez hőinger hatására anélkül, hogy befolyásolná a kapszaicin-, a pH- és a feszültség-szenzitivitást (Szolcsányi és Sándor 2012). Az extracelluláris oldalon alloszterikus modulációs helyeken nyílik lehetőség a csatorna működésének befolyásolására (Welch és mtsai., 2000). A TRPV1 receptorhoz kötődik a kalcium-kalmodulin (CaM) (Numazaki és mtsai., 2003) és a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát (PIP₂) (Prescott és Julius, 2003), melyek szerepet játszanak a receptor aktiváció szabályozásában. A PIP₂ kötődése a C-terminálison található kötőhelyhez fokozza a TRPV1 receptor aktiválhatóságát (Ufret-Vincenty és mtsai., 2011). A receptor ligandum-érzékenységeinek szabályozásában a foszforilációnak/defoszforilációnak fontos szerepe van. A foszforiláció szenzitizálja a TRPV1 receptort, melyben fontos szerepet játszik a protein kináz A (PKA) (Mohapatra és Nau, 2003; 2005), a protein kináz (PKC) (Premkumar és mtsai., 2000; Vellani és mtsai., 2001) és a kalcium-kalmodulin-függő protein kináz II (Jung és mtsai., 2004). A receptor defoszforiláció következményeként kialakuló deszenzibilizáció mértéke csökkenthető a foszfoprotein foszfatáz 2B gátlásával (Docherty mtsai., 1996).



1. ábra: A TRPV1 receptor szerkezete az aktiváció, szenzitizáció és deszenzitizáció szempontjából releváns régiók, aminosavak megjelölésével (Szolcsányi és Sándor, 2012). A: ankirin-ismétlődés domén, CaM: kalcium-kalmodulin, LPA: lizofoszfatsav, PIP₂: foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát, RTX: reziniferatoxin.

A receptor aktivációja során a csatorna megnyílását követően Na⁺ és Ca²⁺ áramlik a sejtbe, melyet K⁺ kifelé irányuló árama követ. Az intracelluláris Na⁺ koncentráció emelkedése a végződés depolarizációját, illetve akciós potenciál kialakulását eredményezi. A Ca²⁺ a végződésben tárolt neuropeptidek exocitózist váltja ki, továbbá fontos szerepet játszik a neuronok későbbi deszenzibilizációjához vezető jelátviteli utak aktiválásában (Koplas mtsai., 1997; Liu és Simon, 1998) (2. ábra).



2. ábra: A TRPV1 receptor működése (Helyes és mtsai., 2003 alapján). CGRP: kalcitonin gén-rokon peptid, SP: P-anyag, NKA: neurokinin A, SST: szomatosztatin, EC: extracelluláris tér, IC: intracelluláris tér.

A TRPV1 receptor a fájdalom farmakológiai befolyásolhatóságának fontos célpontja. A TRPV1 receptorral kapcsolatos kutatások eredményeként közel 1000 szabadalom keletkezett, de a legtöbb vizsgálati szer nem ért el megfelelő terápiás hatékonyságot a klinikai vizsgálatok során. A TRPV1 antagonisták alkalmazhatóságát korlátozzák a preklinikai vizsgálatok során bizonyított mellékhatásaik (hipertermia, hőérzékelési zavar). Jenleg a terápiában a TRPV1 agonista kapszaicin tartalmú készítmények elérhetőek. A 8 % kapszaicin tartalmú Qutenza tapasz hatása a deszenzibilizáció jelenségén alapul (Irving és mtsai., 2011; Webster és mtsai., 2010).

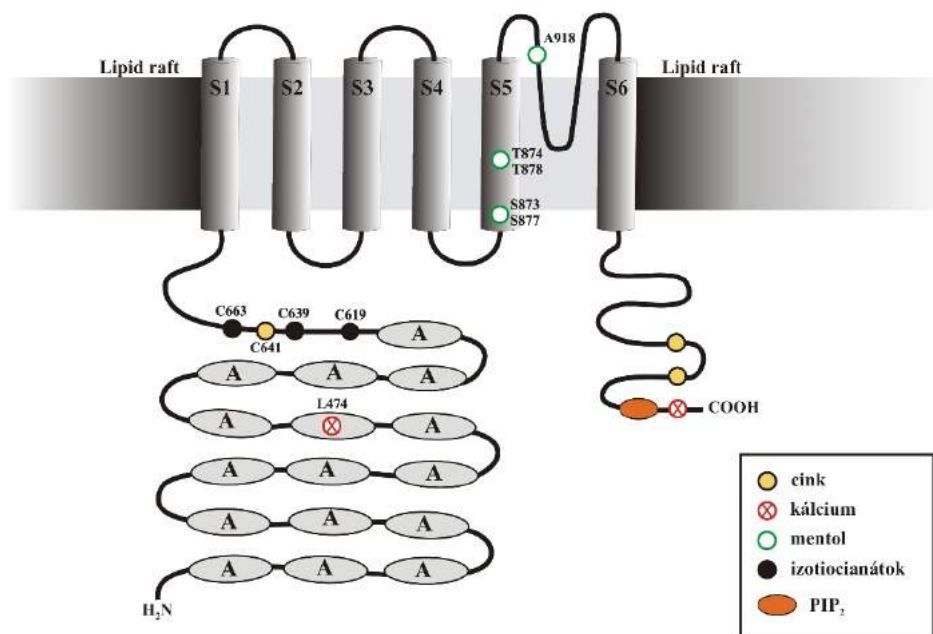
TRPA1 receptor

A TRPA1 és a TRPV1 nagymértékben koexpresszálódik a peptiderg afferens A δ és C rostok egy részében, melyeknek sejttestje a hátsó gyöki ganglionban (DRG), TRG-ben és a *ganglion nodosum*-ban található (Story és mtsai., 2003). A TRPA1 receptor a TRG neuronok 36,5%-án expresszálódik (Nagata és mtsai., 2005). A receptor extraneuronálisan is megtalálható, többek között enterokromaffin sejteken (Nozawa és mtsai., 2009), keratinocitákon (Atoyan és mtsai., 2009) és szinoviocitákon (Kochukov és mtsai., 2006). A TRPA1 receptor szerkezetének jellegzetessége az N-terminálison lokalizálódó nagyszámú (14-18) ankirin ismétlődés (Chen, 2015). A TRPA1 receptort hideg inger (<17 °C), mechanikai ingerek, exogén és endogén ligandok is képesek

aktiválni. Az exogén agonisták legnagyobb hányada természetes eredetű kémiai irritáns, mint az AITC, a formaldehid, az allicin és a fahéjaldehid (Bandell és mtsai., 2004; Jordt és mtsai., 2004; McNamara és mtsai., 2007; Macpherson és mtsai., 2007, Bautista és mtsai., 2005). A legtöbb TRPA1 agonista elektrofil tulajdonságú, melyek receptor aktiváló hatása azon alapul, hogy kovalens kötést létesítenek a receptor N-terminálisán elhelyezkedő nukleofil SH csoportokkal (Hinman és mtsai., 2006). Gyulladásos folyamatok, oxidatív stressz és szövethárosodás során felszabaduló endogén mediátorok is képesek aktiválni a receptort. Ezen agonisták közé tartozik a 4-hidroxi-2-nonenal, 4-oxo-nonenal, 15-dezoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2, 8-izo-prostaglandin A2 és endogén reaktív molekulák (H_2O_2) (Taylor-Clark és mtsai., 2008, Andersson és mtsai., 2008). Endogén gáztranszmitterek (NO, H_2S) is aktiválják a receptort (Takahashi és mtsai., 2008; Andersson és mtsai., 2012). A metilglioxál, mely intracellulárisan akkumulálódik diabéteszben és krónikus veseelégtelenségben, a TRPA1 receptor aktiválásán keresztül neuropátiás fájdalom kialakulásához vezet (Eberhardt és mtsai., 2012). A TRPA1 receptor az oxidatív stressz szenzora, mivel az oxidatív reakciók folyamán keletkező szabad gyökök elektrofil tulajdonságuk következtében képesek direkt módon aktiválni a TRPA1 receptort, mely folyamat hozzájárul a gyulladásos fájdalom kialakulásához. Az intracelluláris Ca^{2+} modulálja a TRPA1 receptor működését, egyrészt direkt módon, másrészt szenzitizálja a receptort (Chen, 2015). Számos G-protein-kapcsolt receptor, mint a bradikinin receptor, a proteáz aktivált receptor 2 TRPA1 receptor szenzitizációt okoz (Bandell és mtsai., 2004; Dai és mtsai., 2007). Ebben a folyamatban a foszfolipáz C (PLC) enzim fontos szerepet játszik, mely a gátló PIP_2 depletálásával és inozitol-triszfoszfát (IP_3)-dependens Ca^{2+} felszabadítással hozzájárul a TRPA1 receptor érzékenyítődéséhez (Dai és mtsai., 2007, Jordt és mtsai., 2004) (3. ábra). A szenzitizáció kialakulásában a PKA szerepét is valószínűsítjük (Wang és mtsai., 2008).

A neuropátiás fájdalom, illetve az akut- és krónikus gyulladás vizsgálata rávilágított a TRPA1 receptor potenciális gyógyszer-célpontként való alkalmazhatóságára. A TRPA1 szelektív antagonistá HC-030031 gyulladásmodellben gátolta a termális és a mechanikai hiperalgéria kialakulását (da Costa és mtsai., 2010). A TRPA1 antagonisták preklinikai vizsgálatából levonható legfontosabb következtetés, hogy a transzláció lehetősége korlátozott, mivel a receptor aminosavszekvenciája fajoként változó. A TRPA1 receptor hőmérséklettel való aktiválhatósága evolúciós különbséget mutat, gerinctelenekben melege érzékeny, rágcsálókban hideg-érzékeny, míg főemlősökben hőmérséklet inszenzitív. Ezzel szemben az elektrofil vegyületek érzékelésének képessége konzerválódott az evolúció folyamán, a receptor mindhárom fajban aktiválható kémiai

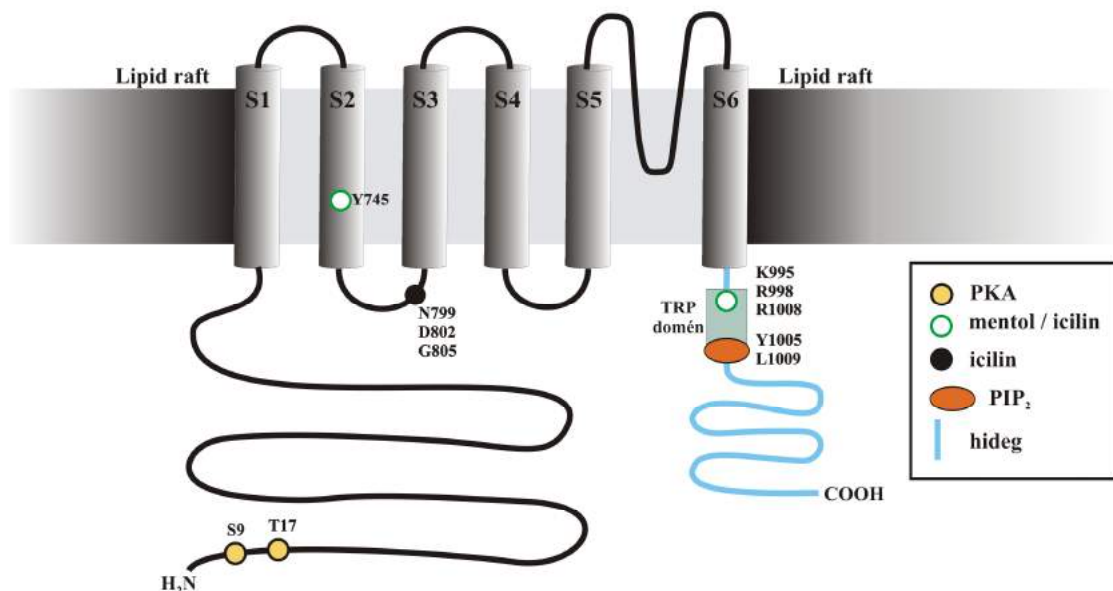
irritánsokkal (Chen, 2015). Mindezek alapján nagy kihívást jelentenek a TRPA1 receptort célzó gyógyszerfejlesztések. Alternatív utat jelenthet a humán TRPA1 receptort expresszáló transzgenikus állatok használatának lehetősége az új analgetikum fejlesztésére irányuló preklinikai vizsgálatok során.



3. ábra: A TRPA1 receptor szerkezete az aktiváció, szenzitizáció és deszenzitizáció szempontjából releváns régiók, aminosavak megjelölésével (Laing és Dhaka, 2016 alapján). A: ankirin-ismétlődés domén, PIP₂: foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát.

TRPM8 receptor

A Tranziens Receptor Potenciál Melasztatin 8 (TRPM8) receptort aktiválja a 26 °C alatti hőmérséklet, a mentol, az icilin és az eukaliptol (Reid és Flonta., 2002; McKemy és mtsai., 2002; Peier és mtsai., 2002; Bautista és mtsai., 2007). TRPM8 receptor a TRG és DRG neuronok 10-15%-án expresszálódik. Szerkezetére jellemző, hogy ellentétben a TRPV1 és TRPA1 receptorokkal, az N-terminális nem tartalmaz ankirin-ismétlődéseket. Hideg érzékelésért felelős szerkezeti egységeket azonosítottak a receptor C-terminálisán (Laing és Dhaka, 2016). Az S2 régió és a TRP domén a mentol- és icilin-érzékenyséért felelős, az S2-S3 közötti hurok szükséges az icilin által kiváltott TRPM8 receptor aktivációhoz (Bandell és mtsai., 2006; Chuang és mtsai., 2004). A PIP₂ kötődése a TRP doménhez receptor szenzitizációt okoz. A PIP₂ hidrolízise PLC által a receptor aktiválhatóságát gátolja. A PLC-PIP₂ mellett egyéb jelátviteli utak is modulálják a TRPM8 receptort, a PKA és a PKC negatívan befolyásolják a TRPM8 receptor működését (Premkumar és mtsai., 2005; Laing és Dhaka, 2016) (4. ábra).



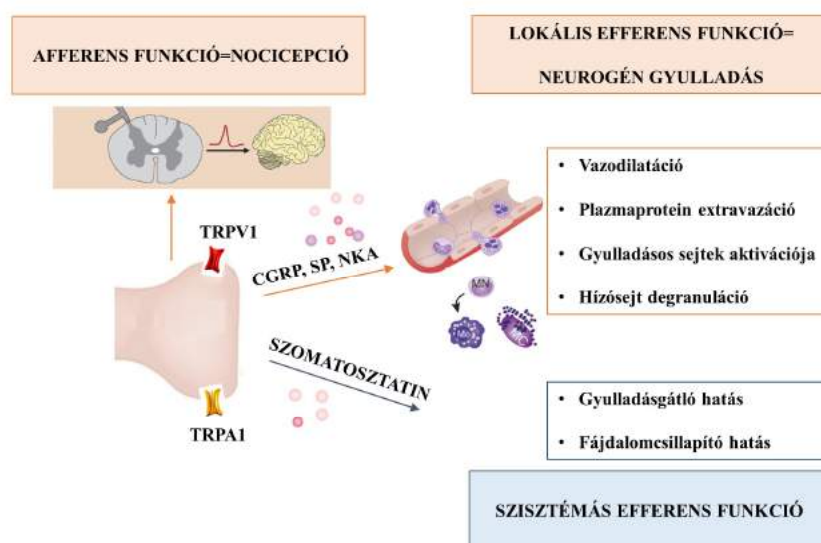
4. ábra: A TRPM8 receptor szerkezete az aktiváció, szenzitizáció és deszenzitizáció szempontjából releváns régiók, aminosavak megjelölésével (Laing és Dhaka, 2016 alapján). PIP₂: foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát, PKA: protein kináz A.

TRPM3 receptor

A Transiens Receptor Potenciál Melasztatin 3 (TRPM3) receptorral kapcsolatosan a másik három termoszenzitív TRP receptorhoz képest kevésbé intenzív kutatások folytak. A TRPM3 receptor számos neuronális és nem neuronális szövetben expresszálódik (Grimm és mtsai., 2003; Oberwinkler és Philipp, 2014). Az érzőneuronok közel 80%-án fejeződik ki a receptor (Vriens és mtsai., 2011). A neuroszteroid pregnenolon-szulfát a receptor legpotensebb agonistája, mely számos szteránvázas hormon prekursora (Wagner és mtsai., 2008). A szulfát-csoport jelenléte és sztereokémiai helyzete a TRPM3 receptor aktiváló hatás szempontjából kulcsfontosságú (Drews és mtsai., 2014). Egyéb szteránvázas vegyületek, mint az epipregnenolon-szulfát és a dihidro-D-eritro-szfingozin is képes aktiválni a receptort. A TRPM3 receptoron specifikus szteroid kötőhelyet valószínűsítene (Vriens és mtsai., 2011; Majeed és mtsai., 2010; Grimm és mtsai., 2005) és a plazmamembránon való átjutásában alternatív útvonalakat azonosítottak (Vriens és mtsai., 2014). A TRPV1 receptorhoz hasonlóan, a TRPM3 receptor is feszültség-érzékenységet mutat. A TRPM3 receptor részt vesz az akut hőérzékelésben (hőmérsékleti aktivációs küszöbe 40 °C) és a hiperalgéria kialakulásában, mely alapján célpontként szolgálhat analgetikum fejlesztésben (Vriens és mtsai., 2011).

3.1.3 A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződések

Az érzőideg-végzések egy speciális típusát alkotják a kapszaicin-érzékeny peptiderg afferensek, melyek hármas funkcióval rendelkeznek; klasszikus afferens valamint lokális és szisztémás efferens működéseket közvetítenek (5. ábra). A klasszikus afferens működés során az aktivált érzőideg-végzések a központi idegrendszer felé közvetítenek idegaktivitást, melynek eredménye a nocicepció kialakulása. A kapszaicin-érzékeny neuronok az afferens nociceptív transzmisszió kivül efferens funkcióval is rendelkeznek (Szolcsányi, 1996). A TRPV1 receptor aktivációja során az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedése a végződésben tárolt neuropeptidek (CGRP, SP) exocitózist idézi elő, melyek a beidegzés területén vazodilatációt és plazmaprotein extravazációt váltanak ki. Ez az érzőideg-végzések lokális efferens funkciója (Szolcsányi, 1984 a; b; Maggi és Meli, 1988), melynek következtében kialakul a neurogén gyulladás (Jancsó és mtsai., 1967; 1968). Ezt a folyamatot a jelenleg használatos gyulladáscsökkentők nem képesek hatékonyan befolyásolni. Számos gyulladásos betegségről igazolódott be (pl. reumatoid arthritisz, asztma, gyulladásos bélbetegségek), hogy patomechanizmusában a neurogén komponens fontos szerepet játszik (Szolcsányi 1996). Kutatócsoportunk bizonyította, hogy az aktivált érzőideg-végződésből a gyulladásokeltő neuropeptideken kívül szomatosztatin is felszabadul, mely szisztémás gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatást fejt ki. Ez az érzőideg-végzések szisztémás efferens funkciója melyet szenzokrin működésként definiáltak (Helyes és mtsai., 2000; Szolcsányi és mtsai., 1998; Szolcsányi, 2004). Ez a jelenség árnyalja a TRPV1 receptor „fájdalom integrátor” szerepéről kialakított képet.

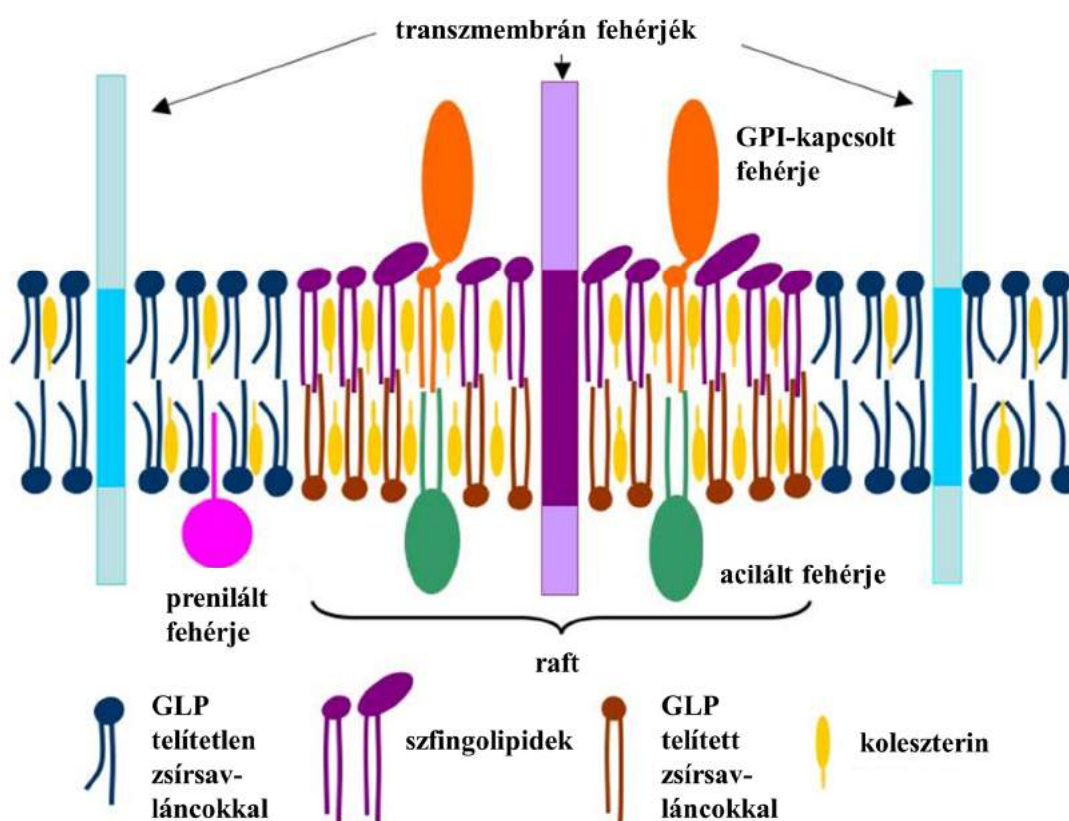


5. ábra: A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végzések hármas funkciója. CGRP: kalcitonin gén-rokon peptid, SP: P-anyag, NKA: neurokinin A.

3.1.4 A lipid raft modell

A Singer és Nicolson-féle folyékony mozaik modell szerint a lipid kettősrétegben a plazma proteinek random módon helyezkednek el (Singer és Nicolson, 1972). A korszerű biokémiai és morfológia vizsgálatok eredményeivel a fent említett modell van a leginkább összhangban, mely a biológiai membránok szerkezetének legelfogadottabb elmélete. A modell azonban nem tudta magyarázni az egyes integráns membrán fehérjék inhomogén eloszlását a sejtfelszínen. Újabb elmélet szerint a plazmamembránban mikrodomének találhatók, melyek struktúrája, lipid- és fehérje összetétele eltér a környezetétől. A legismertebb mikrodomének a kis méretű (10-200 nm) lipid tutajok (raftok). A tutaj elnevezés magyarázata, hogy nagyfokú laterális mobilizációjuk következtében a komponensek bizonyos körülmények között nagyobb aggregátumokat „platformokat” képezhetnek, mely kisebb mozgásokat végez, „úszik” a plazmamembránban. A lipid raft modell szerint a lipidek nem random helyezkednek el a plazmamembránban, hanem a fehérjékkel együtt magas fokú lokális rendezettséget mutatnak, míg a membrán egyéb területei a rendezetlen fázist alkotják (Rietveld és mtsai., 1998). A lipid raftok számos fizikai-kémiai tulajdonsága eltér a környező membránra jellemző paraméterektől, sűrűségük alacsonyabb, telített lipidekben, koleszterinben, szfingolipidekben és proteinekben gazdagok. A lipid raftok jellegzetes tulajdonsága, hogy 4 °C-on Triton X-100 detergensben oldhatatlanok, innen ered a detergens-oldhatatlan-glikolipid-gazdag komplex elnevezés. Ezen tulajdonságuk alapján lehetővé vált a lipid raftok kivonása a plazmamembrán non-raft régiói közül, illetve az itt található proteinek és lipidek identifikálása (Simons és Ikonen, 1997; Mishra és Joshi, 2007). A lipid kettősréteg a raftokon belül aszimmetrikus, az extracelluláris oldal szfingolipidekben (szfingomielin és glikoszfingolipid) gazdag, míg az intracelluláris oldalon glicerofosfolipidek fordulnak elő nagyobb mennyiségben. A koleszterin eloszlása szimmetrikus, a membrán extra- és intracelluláris oldalán hasonló arányban jelenik meg (Simons és Ikonen, 1997; Kobayashi és mtsai., 2006). A raftok szerkezetének kialakításában és funkciójában a koleszterin kulcsfontosságú (Kannan és mtsai., 2007). A membrán koleszterin tartalmának csökkentése a raftok szétesését (Brown és London, 2000) és a detergens-oldhatatlanság megszűnését okozza. A lipid raft komponensekhez a proteinek intracelluláris proteinként, transzmembrán proteinként, vagy glikozil-foszfatidil-inozitol (GPI)-kapcsolt proteinként kötődhetnek (Simons és Ikonen, 1997; Mishra és Joshi, 2007) (6. ábra).

A lipid raftok egy specifikus alcsoportjába tartoznak a kaveolák, melyek kaveolin fehérjetartalmú, 50-100 nm-es jellegzetes morfológiával rendelkező régiók. A lipid raftokhoz hasonlóan a kaveolák is szfingolipidekben és koleszterinben gazdagok, detergensben oldhatatlanok (Ostrom és Insel, 2004). Keresztmetszeti elektronmikroszkópos felvételeken Ω alakúak és általában csoportosan helyezkednek el a plazmamembránban (Anderson és Jacobson, 2002). A lipid raftokkal összekapcsolódva intracelluláris jelátviteli utak generálásában vesznek részt (Simons és Ikonen, 1997). Emellett szerepet játszanak a sejtszétválásban, a sejtek koleszterin homeosztázisában (Anderson és Jacobson, 2002), valamint részt vesznek a patogén baktériumok és bizonyos vírusok fertőzési mechanizmusában (Samuel és mtsai., 2001).



6. ábra: A lipid raftok szerkezete (Waheed és Freed, 2010 alapján). A foszfolipidek (sötétkék, barna) és a koleszterin (sárga) a membrán mindkét oldalán megtalálhatóak, míg a szfingolipidek (lila) az extracelluláris oldalon vannak jelen. A raftokon belül a lipidek hosszú láncú és telített zsírsavakat tartalmaznak (lila, barna), míg a non-raft doménben lévő zsírsavláncok rövidebbek és egyszeresen vagy többszörösen telítetlenek (kék). A raft domének kétszeresen acilált (zöld) és GPI-kapcsolt (barna) proteineket, míg a transzmembrán- (világoskék) és prenilált fehérjék általában a non-raft régiókhoz asszociálódnak. GPI-kapcsolt: glikozil-foszfatidil-inozitol-kapcsolt, GLP: glikoszíngolipid.

3.1.5 A lipid raftok funkciói

Funkcionális szempontból a membrán raftoknak számos alapvető sejtfiziológiai folyamatban tulajdonítanak fontos szerepet; szabályozzák a membrántranszport folyamatokat, patogén baktériumok és vírusok fertőzési mechanizmusát és a sejtmigrációt (Parton és Richards, 2003, Manes és mtsai., 2003). A lipid raftok fontos szerepet töltenek be a lipidek és a fehérjék sejtfelszíni eloszlásának szabályozásában, elősegítik a jelátvitel szempontjából fontos molekuláris kölcsönhatások kialakulását és hozzájárulnak különböző molekulák lokális koncentrációjának növekedéséhez (Bini és mtsai., 2003).

A lipid raftokban lokalizálódó receptorok megfelelő működése szempontjából alapvető fontosságú a strukturált szerkezetű membrán egységek szerkezeti integritása. A TRP receptor család számos tagja képez ún. jelátviteli komplexet a lipid raftokban (Lockwich és mtsai., 2000; Liu és mtsai., 2006). A TRP receptorokon kívül a 2-amino-3-metil-(3-hidroxi-5-metil-izoxazol-1-il)-propionsav/AMPA típusú glutamát receptor, a γ -aminovajsav/GABA receptor, az acetilkolin nikotin receptor (Zhu mtsai., 2006) a szinaptikus lipid raftokban koncentrálnak. A raftok fontos szerepet töltenek be a neurotranszmitterek felszabadulásában és a szinaptikus funkciókban (Guirland mtsai., 2004; Hering és mtsai., 2003).

3.1.6 A lipid raftok farmakológiai vizsgálata

A lipid raftok kutatása fontos momentuma a farmakológiai alapkutatásoknak, mert alternatív utat jelent a receptormolekulák és ezen keresztül a jelátviteli utak befolyásolásában. Két fő irány létezik a lipid raft diszrupció elérésére, az egyik lehetőség a lipid raft fontos komponenseinek depletálása, a másik irány a raft komponensek felépülésének gátlása. A plazmamembrán koleszterin tartalmának depletálása metil- β -ciklodextrinnel (MCD) széles körben alkalmazott módszere a lipid raft kutatásnak. Az MCD hét α -D-glükopiranoz egységből álló ciklikus oligoszacharid, mely koleszterinnel ún. zárványkomplexet képez. Kutatócsoportunk bizonyította, hogy az MCD kezelés befolyásolja a TRPV1 receptor működését (Szőke és mtsai., 2010). A szfingomielináz enzim a plazmamembrán szfingomielin tartalmát alakítja foszfokolinná és ceramiddá (Kobayashi mtsai., 2006; Kiyokawa és mtsai., 2005). A szfingomielináz hatásában három részfolyamatot különíthetünk el: (1) a szfingomielin felszabadulása a raft membránban, (2) a szfingomielin diffúziója a reakció helyére, (3) az enzimreakció folyamata, szfingomielin hidrolízis (Chao és mtsai., 2011). A myriocin a szfingolipid szintézis

sebességmeghatározó lépését katalizáló szerin-palmitoiltranszferáz enzimet gátolja. A D-treo-1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolino-1-propanol/D-PDMP a glikoszfingolipidek szintézisében szerepet játszó ceramid-glükoziltranszferáz enzim inhibitora (Kobayashi és mtsai., 2006). A hidroximetil-glutaril-koenzim A/HMG-CoA-reduktáz inhibitorokkal a koleszterin szintézis gátolható (Miyake és mtsai., 1995).

A lipid raftok TRP receptorok működésében betöltött szerepének feltérképezését célzó kísérletek ellentmondásos eredményeket szolgáltattak. Az MCD kezelés nem befolyásolta a hő által kiváltott áramokat TRPV1-transzfektált HEK293 sejteken (Liu és mtsai., 2003), azonban gátló hatást fejtett ki a kapszaicin és protonok által kiváltott TRPV1 áramokra DRG neuronokon (Liu és mtsai., 2006). A ³[H]RTX TRPV1 receptorhoz való kötődését C6 glioma sejteken nem befolyásolta a koleszterin depléción (Bari és mtsai., 2005). Az MCD kezelés a TRPM8 receptor hőaktivációs küszöbét megemelte (Morenilla-Palao és mtsai., 2009). Kutatócsoportunk korábbi eredményei alapján a lipid raft fontos szerkezeti elemeinek depletálása vagy felépülésének gátlása szignifikánsan csökkentette a kapszaicin-indukált TRPV1 receptor aktiválhatóságát érzőneuronokon és TRPV1 receptor-expresszáló sejtvonalon (Szőke és mtsai., 2010).

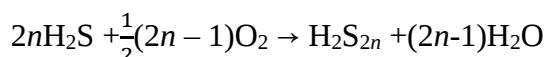
3.2 A hidrogén-szulfid donor vegyületek és a DMTS target molekulájának azonosítása

3.2.1 A hidrogén-szulfid és a poliszulfidok szintézise, metabolizmusa

A hidrogén-szulfid a harmadik ismert gázmediátor emlős szervezetben a szén-monoxid (CO) és a nitrogén-monoxid (NO) mellett, mely a sejten belüli jelátviteli folyamatokat vezérlő gáz természetű kismolekulák legfrissebben felfedezett tagja (Wang és mtsai., 2012). A H₂S szintézise L-ciszteinből történik, cisztationin-β-szintáz (CBS), cisztationin-γ-liáz (CSE), 3-merkaptopiruvát-szulfurtranszferáz (3-MST) és cisztein-aminotranszferáz enzimek által katalizált reakciók folyamán. A CBS elsősorban a központi idegrendszerben lokalizálódik (*hippocampus*, kisagy, agykéreg, agytörzs) míg a CSE főként a kardiovaszkuláris rendszerben expresszálódik (aorta, mesenterialis artéria, portális véna) (Guo és mtsai. 2013; Miyamoto és mtsai., 2014; 2015). A 3-MST enzim megtalálható az agyban, a májban, vesében, tüdőben és a lépben. Újabb kutatások bizonyítják, hogy a H₂S D-ciszteinből is keletkezhet 3-MST és D-aminosav-oxidáz hatására (Shibuya és mtsai., 2013). A H₂S metabolizmusa a mitokondriumban elsősorban szulfid-kinon-reduktáz enzim által vezérelt. A szulfidlebontás kezdeti lépéseként az

enzim intramolekuláris diszulfid csoportjának redukciója révén szulfid-kinon-reduktáz-perszulfid köztitermék alakul ki. Ezt követően a tioszulfát-glutation-szulfurtranszferáz enzim glutationból glutation-perszulfidot képez. A keletkezett terméket a szulfurdioxidáz enzim alakítja szulfittá. A szulfitból a szulfid-oxidáz enzim révén szulfát, illetve szulfid-kinon-reduktáz enzim katalizált reakcióban tioszulfát képződik. (Kimura és mtsai., 2014; Nagy, 2015).

A poliszulfidok H_2S -ből képződnek oxigén jelenlétében az alábbi reakcióegyenletek szerint (Kimura és mtsai., 2013):



3.2.2 A hidrogén-szulfid és a poliszulfidok élettani hatásai

A H_2S biológiai szerepének a kutatása robbanásszerű fejlődést mutatott az elmúlt évtizedben, fontos szerepet játszik a kardiovaszkuláris rendszerben, a gasztrointesztinális traktusban és gyulladásos folyamatokban.

A kardiovaszkuláris rendszerben a H_2S részt vesz a kontraktilitás és a vérnyomás szabályozásában, a portális vénát és a mesenterialis artériát relaxálja. Alacsony koncentrációban azonban vazokonstriktor hatását figyelték meg, melynek hátterében a vazodilatátor NO-szint csökkentését feltételezik (Guo és mtsai., 2013). A H_2S protektív hatását bizonyították ateroszklerózisban, mely intracelluláris adhézis molekulák expressziójának gátlásán keresztül valósul meg (Qiao és mtsai., 2010). Neuroprotektív hatásának alapja a reaktív szabad gyökök megkötése, illetve a glutation koncentráció emelése (Qu és mtsai., 2008). Sejtvédő hatásai következtében az iszkémia-reperfúziós károsodást mérsékli. A H_2S mérsékli a β -amiloid által okozott citotoxicitást. (Liu és mtsai., 2011). Gyulladásos folyamatokban a H_2S pro- és antiinflammatorikus hatásokat is közvetíthet, a gyulladás típusától és a H_2S mennyiségétől függően. A lipopoliszacharid-indukált gyulladást a CSE inhibitor csökkentette, az NaHS alkalmazása emelkedett TNF α plazmakoncentrációt eredményezett (Li és mtsai., 2005). Ezzel szemben számos közlemény számol be gyulladásgátló hatásáról. Karragénnel kiváltott artritisz modellben a H_2S -donor vegyületek koncentrációfüggő módon gátolták a leukocita infiltrációt, míg a H_2S bioszintézist gátló vegyületek súlyosbították a gyulladás folyamatait (Zanardo és mtsai., 2006). Egy másik közlemény szerint azonban ugyenebben a modellben a CSE inhibitor dózisfüggő módon csökkentette az ödéma súlyosságát. (Bhatia és mtsai., 2005).

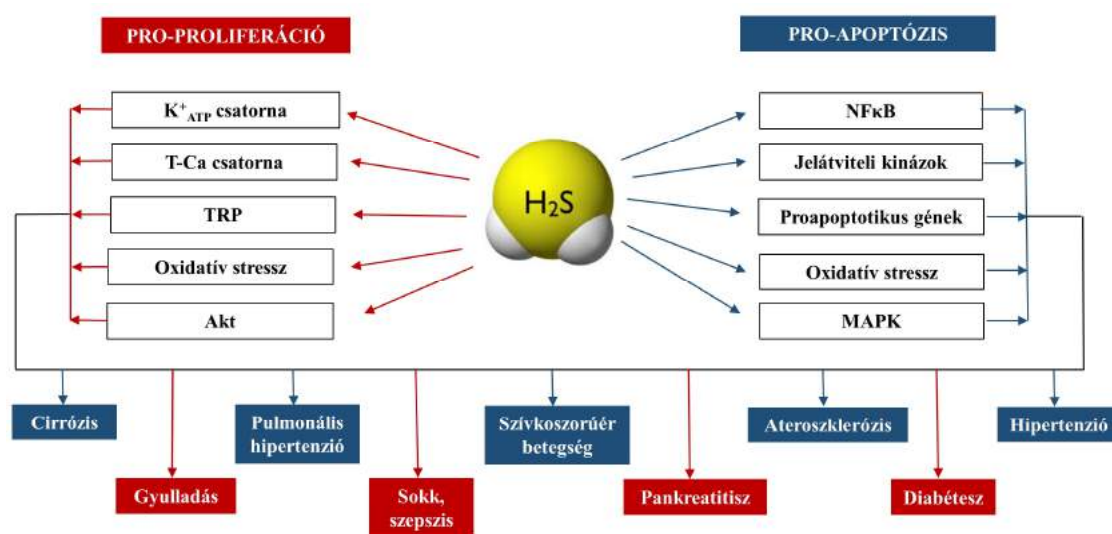
A gasztrointesztinális rendszerben részletesen tanulmányozták a H₂S hatásait. Az endogén hidrogén-szulfid fő forrásai a H₂S termelő bélbaktériumok. A gasztrointesztinális motilitást az exogén H₂S gátolja (Linden és mtsai., 2010). A H₂S donor vegyületek szignifikánsan csökkentették a colitis súlyosságát és a proinflammatorikus citokinek expresszióját (Wallace és mtsai., 2009). A H₂S donor vegyületek kombinációban való alkalmazása NSAID-dal előnyös, mind a terápiás hatás, mind a mellékhatások tekintetében. A H₂S-t felszabadító naproxen (ATB-346) a gyulladásgátló hatás tekintetében a naproxennel megegyező hatékonysággal rendelkezett, azonban mérsékeltebb gasztrointesztinális károsodást okozott (Wallace és mtsai., 2010). Érdekes jelenség a H₂S alkalmazását követően kialakuló hipometabolizmus („suspended animation”), mely a gáztranszmitter metabolikus hatásának következménye. Az állatkísérletekben detektált állapot tünetei: a maghőmérséklet és a légzésfrekvencia csökkenése (Blackstone és mtsai., 2005). A poliszulfid vegyület, a diallil-triszulfid gátolta *colitis ulcerosa* gyulladásos folyamatait, mely a TNF α expresszió és az NF κ B aktivitás csökkentésén keresztül valósult meg (Bai és mtsai., 2005). Emellett a diallil-triszulfid protektív hatást gyakorolt a szívizomsejtekre iszkémia-reperfúziós károsodás esetén (Predmore és mtsai., 2012).

3.2.3 A hidrogén-szulfid és a poliszulfidok molekuláris célpontjai

A H₂S szignalizációs útvonalai, hatásmechanizmusa nem teljesen tisztázott, számos molekuláris célpontot azonosítottak (7. ábra).

A H₂S egyik legfontosabb hatása a kontraktilitás szabályozása, melynek mechanizmusát intenzíven kutatják. Számos közlemény szerint a vazodilatátor hatásért K⁺_{ATP} csatornák megnyílása felelős. A H₂S nociceptív hatásának hátterében a T-típusú feszültségfüggő kalcium csatornák indirekt aktivációja állhat. Ennek magyarázta, hogy a H₂S a Zn²⁺ koncentrációját csökkenti, mely a Cav3.2 inhibitora (Matsunami és mtsai., 2011). Számos kísérleti elrendezésében bizonyították a H₂S és a poliszulfidok TRPA1 receptor aktiváló hatását. TRPA1 receptor-expresszálo kínai hörcsög ovárium (CHO) sejteken végzett *in vitro* kísérletben Ca²⁺ szignált detektáltak H₂S hatására (Streng és mtsai., 2008). Izolált patkány DRG sejteken az NaHS által kiváltott intracelluláris Ca²⁺ koncentráció ([Ca²⁺]_i) emelkedést gátolta a TRPA1 szelektív antagonist (HC-030031) és az extracelluláris Ca²⁺ koncentráció csökkentése etilén-glikol-tetraecetsavval (EGTA). A TRPV1 szelektív antagonist iodoreziniferatoxin és az L-, N- és T-típusú feszültségfüggő kalcium csatorna blokkoló vegyületek sem befolyásolták a válaszokat (Miyamoto és mtsai., 2011).

Kutatócsoportunk bizonyította, hogy a TRPA1 antagonista HC-030031 gátolta az NaHS CGRP exocitózist kiváltó hatását perifériás érzőidegvégződéseken, valamint az antagonista jelenlétében az NaHS vazodilatátor hatása kevésbé érvényesült. Ezen eredmények azt a feltételezést erősítik, mely szerint a H₂S értágító hatását TRPA1 receptor aktivációt követő perifériás érzőideg-végződésből felszabaduló CGRP okozza. (Pozsgai és mtsai., 2012). Egy másik munkacsoport izolált mesenterialis artériák dilatációját figyelte meg NaHS alkalmazása után, melynek hátterében szintén a TRPA1 receptor aktivációval összefüggő CGRP exocitózist feltételeztek (White és mtsai., 2013). A szerves poliszulfid vegyületek TRPA1 receptor aktivációt okoznak asztrocitákon és szenzoros neuronokon (Kimura és mtsai., 2013; Hatakeyama és mtsai., 2015). A H₂S gyulladásos folyamatokra kifejtett hatása kapcsolatban áll a nukleáris faktor κ B (NF κ B) útvonallal. Humán emlőkarcinóma sejtvonalon bizonyították, hogy a H₂S-t felszabadító aszpirin ezt a szignáltranszdukciós utat gátolja (Chattopadhyay és mtsai., 2012). A H₂S metabolikus hatása a citokróm c-oxidáz enzimen keresztül a mitokondriális légzési lánc gátlása. Újabb kutatások szerint protektív hatást fejt ki a reaktív oxigén gyökök (ROS) károsító hatásaival szemben, melynek feltételezett mechanizmusa a ROS-sal való reakció.



7. ábra: A H₂S molekuláris célpontjainak részvétele a különböző hatásokban (Guo és mtsai., 2013 alapján). NF κ B: nukleáris faktor κ B, MAPK: mitogén-aktivált protein kináz.

3.3 A PACAP receptor agonisták és antagonisták hatásának vizsgálata

3.3.1 A PACAP előfordulása szervezetben és élettani hatásai

A *hypophysis* adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) izolálása 1989-ben történt birka *hypothalamus*-ból, *hypophysis*-ben kifejtett adenilát-cikláz stimuláló képessége alapján. A PACAP a szekretin-glukagon-VIP peptidcsalád tagja, szerkezete 68%-os egyezést mutat a VIP struktúrájával (Miyata és mtsai., 1989). Az emlős szervezetben előforduló PACAP közel 90%-át a 38 aminosavat tartalmazó PACAP1-38 teszi ki, a 27 aminosavból álló rövidebb fragmens kisebb mennyiségben van jelen (Arimura és mtsai., 1991). A PACAP aminosavszekvenciája nagymértékben konzerválódott az evolúció folyamán, mely a neuropeptid fontos élettani szerepére utal. (Arimura és mtsai., 1998; Vaudry és mtsai., 2000). A peptid metabolizálásában a dipeptidil-peptidáz IV (DPP IV) vesz részt, mely az N-terminális aminosavakat hasítja. Mivel az N-terminális jelenléte a biológiai aktivitás feltétele, de nem szükséges a receptorkötődéshez, a keletkezett fragmensek biológiai aktivitással nem rendelkeznek, de képesek kötődni a PACAP receptorokhoz. A DPP IV termékei antagonistaként viselkednek, ezek közé tartozik a PACAP6-38 (Vandermeers és mtsai., 1992).

A szervezetben a PACAP a központi- és perifériás idegrendszerben, valamint nem idegi struktúrákban is megtalálható. A PACAP a központi idegrendszerben legnagyobb mennyiségben a *hypothalamus*-ban detektálható, emellett expresszálódik az agykéregben, a középgagyban, a bazális ganglionokban, a *hippocampus*-ban, a *thalamus*-ban, a *hypophysis*-ben és a kisagyban (Arimura, 1998; Vaudry és mtsai., 2000). A neuropeptid a humán agytörzs ún. „migrén-generátor” régiójának sejtestjeiben és idegrostjaiban (Tajti és mtsai., 2001), a TNC-ben, a nyaki gerincvelő C1-C2-es szegmentumaiban (Uddman és mtsai., 2002) és a *dura mater* hízósejtjeiben is megtalálható (Theoharides és mtsai., 2005). A PACAP jelenlétét kimutatták a fájdalomközvetítő pályarendszerben: a gerincvelő hátsó szarvában, DRG-ben és TRG-ben (Moller és mtsai., 1993; Mulder és mtsai., 1994) és a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok perifériás végződéseiben (Fahrenkrug és Hannibal, 1998). Számos nem neuronális szövetben is expresszálódik, többek között az endokrin- és exokrin mirigyekben (Vígh és mtsai., 1993; Mikkelsen és mtsai., 1995), a gasztrointesztinális traktus teljes hosszában (Hannibal és mtsai., 1998) és a mellékvese chromaffin sejtjeiben (Ghatei mtsai., 1993).

A PACAP szerteágazó élettani hatásokkal rendelkezik. A neuropeptid fontos szerepet játszik az *adeno-* és *neurohypophysis* hormontermelésének szabályozásában. A PACAP serkenti a pajzsmirigy tiroxin elválasztását, stimulálja a mellékvese katekolamin szintézisét, a gonádok szteroid- és a hasnyálmirigy inzulin termelését (Vaudry és mtsai., 2009). Az idegrendszeri differenciálódásban is kulcsfontosságú, emellett antiapoptotikus tulajdonsága következtében neuroprotektív hatással rendelkezik (Vaudry és mtsai., 1998). Potens vazo- és bronchodilatátor, szabályozza a neurotranszmitterek felszabadulását (May és mtsai., 2000), befolyásolja a gasztrointesztinális-, valamint a légúti motilitást és szekréciót (Barthó és mtsai., 2000; Oh és mtsai., 2005). A PACAP fontos szerepet tölt be a fájdalomérzés központi és perifériás szabályozásában (Davis-Taber és mtsai., 2008; Helyes és mtsai., 2007), a cirkadián ritmus- és hőszabályozásban (Hannibal, 2006; Murck és mtsai., 2007; Pataki és mtsai., 2000). A PACAP hőszabályozásban betöltött szerepét részletesen tanulmányozó közlemény szerint nemcsak az exogén PACAP vesz részt a folyamatban, hanem az endogén PACAP is szerepet játszik a normál testhőmérséklet fenntartásában, ami a PACAP génhiányos (PACAP^{-/-}) egerek hőszabályozási fenotípusában is megnyilvánul (Bánki és mtsai., 2014).

3.3.2 A PACAP receptorok

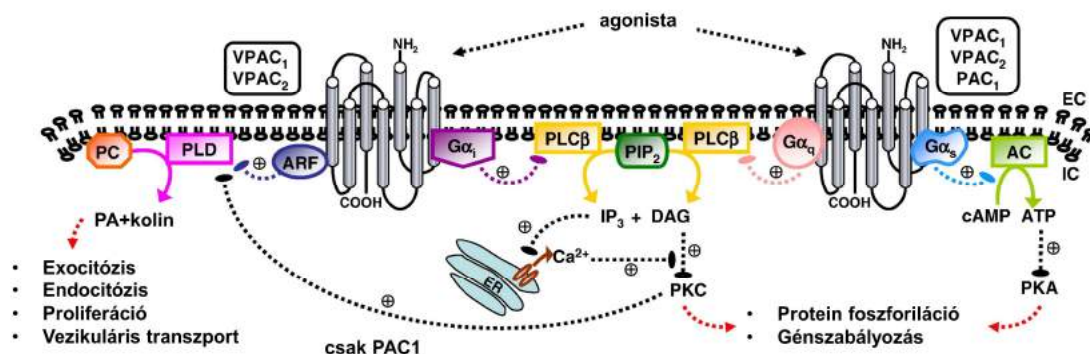
A PACAP hatását a szervezetben G-protein-kapcsolt receptorok közvetítik, melyeknek két fő típusa a PAC1 és a VPAC receptorok. A PAC1 receptorhoz 2-3 nagyságrenddel nagyobb affinitással kötődik a PACAP, mint a VIP, míg a két neuropeptid a VPAC receptorokhoz hasonló kötődési hajlamot mutat (Laburthe és Couvineau, 2002; Laburthe és mtsai., 2007). A VPAC receptorok két altípusra oszthatók, a VPAC1 receptorokhoz a szekretin nagyobb affinitással kötődik, míg a VPAC2 receptorhoz a helodermin mutat kifejezettebb kötődési hajlamot (Vaudry és mtsai., 2000).

A PACAP receptorok szöveti eloszlását részletesen tanulmányozták. VPAC1 receptor expressziót detektáltak a központi idegrendszer számos területén (*cortex*, *gyrus dentatus*, *amygdala*, *putamen*, *nucleus supraopticus*, *plexus choroideus*). A periférián a májban, a lépben, a prosztatában, a vesében és a gasztrointesztinális traktusban mutatták ki a VPAC1 receptor jelenlétét. A VPAC2 receptor expresszálódik az alábbi területeken: *cortex*, *nucleus periventricularis*, *nucleus suprachiasmaticus*, *thalamus*, *hypothalamus*, *amygdala*, vastagbél, hasnyálmirigy, mellékvese. A PAC1 receptor a központi idegrendszer (*hippocampus*, *area postrema*, *cortex*, *hypothalamus*, *amygdala*, *thalamus*,

nucleus suprachiasmaticus) mellett megtalálható a mellékvesében, méhben, herében, bélben (Vaudry és mtsai., 2000). Mindhárom PACAP receptor jelenlétét kimutatták simaizomsejteken, neuronokon és számos gyulladásos sejten (Joo és mtsai., 2004; Vaudry és mtsai., 2000; 2009). A PACAP receptorok számos splice variánsát identifikáltak, melyek különböző jelátviteli útvonalakat generálhatnak, a receptorok farmakológiai jellemzőit módosíthatják. Legnagyobb számú splice variánst a PAC1 receptor esetében azonosítottak. A PAC1hip, hop₁, hop₂, hip-hop₁, hip-hop₂ a 3. intracelluláris hurokrégióban található „hip” és/vagy „hop” szekvenciákat tartalmazó variánsok, míg a „short” variánsban nincsenek jelen ezek a szakaszok. A „very short” változat jellemzője, hogy az N-terminális végen hiányzik a 21 aminosavat tartalmazó extracelluláris domén, mely befolyásolja a ligandumok kötődését és a másodlagos messengerek keletkezését. A PAC1TM4 variáns a „short” változattól a 2. és 4. transzmembrán doméneken lévő szakaszokban tér el (Arimura, 1998; Dickson és Finlayson, 2009; Vaudry és mtsai., 2000; Pantaloni és mtsai., 1996; Dautzenberg és mtsai., 1999; Holighaus és mtsai., 2011).

A VPAC/PAC receptorok Gs-protein-függő intracelluláris ciklikus adenosin-monofoszfát ([cAMP]_i) emelkedést, valamint Gq-protein-dependens PLC_β aktivációt közvetítenek (Holighaus és mtsai., 2011). Emellett számos intracelluláris jelátviteli molekula és útvonal játszik szerepet a PACAP hatásának közvetítésében (Vaudry és mtsai., 2009). A VPAC/PAC receptorok aktivációja [Ca²⁺]_i emelkedéséhez vezet, valamint modulálja a foszfolipáz D (PLD), tirozin-kinázok, kalcium csatornák, RhoA GTPáz, mitogén-aktivált protein kináz (MAPK), CO és Src aktivitását. Ezen mechanizmusok közül részletesen tanulmányozták a PLD és a [Ca²⁺]_i másodlagos messengerek által közvetített jelátviteli útvonalakat. A PACAP receptorok klónozását megelőzően már bizonyítást nyert, hogy a VIP és a PACAP számos sejttypusban (PC12 sejtek, *hypothalamus* neuronok, SK-N-SH humán *neuroblastoma* sejtek, patkány *ganglion cervicale superius*) emeli a [Ca²⁺]_i-t. A receptorok klónozását követően vált lehetővé a mechanizmus pontosabb felderítése. A [Ca²⁺]_i emelkedés hátterében G_i- és G_q-protein-kapcsolt jelátviteli útvonalakat azonosítottak, melyek közül a G_q útvonal megközelítőleg 40%-ban járul hozzá a [Ca²⁺]_i növekedéséhez VPAC receptor expresszázó sejt vonalakon. Ezzel szemben a PAC1 receptor mediált [Ca²⁺]_i emelkedés hátterében kizárólag G_q-protein-kapcsolt szignáltranszdukciót bizonyítottak. A komplex [Ca²⁺]_i emelkedéshez vezető mechanizmusokkal ellentétben, a VPAC és PAC1hop1 splice variáns aktivációját követő PLD stimuláció ADP-riboszilációs faktor (ARF)-függő módon valósul meg. A PAC1null receptor közvetített PLD stimuláció ARF független, PKC-dependens útvonalon keresztül jut érvényre (8. ábra). A G-proteinek olyan járulékos

fehérjékkel lépnek interakcióba, melyek szerepet játszanak a jelátviteli folyamatokban (Couvineau és Laburthe, 2012 a, b). A VPAC/PAC receptorokon megvalósuló szignáltraszdukciós folyamatok komplexitását fokozza, hogy a receptorok képesek receptor aktivációt módosító proteinekkel (RAMP) interakcióba lépni (Vaudry és mtsai., 2000).



8. ábra: A PACAP receptorokon megvalósuló jelátviteli útvonalak (Dickson és Finlayson, 2009). Aktiváció hatására mindhárom PACAP receptor képes G_{α_s} -proteinnel kapcsolódni, ezáltal megnövelni az intracelluláris cAMP szintet. Emellett a PACAP receptorok G_{α_i} proteinen keresztül PLC_{β} aktivációt okoznak, mely $[Ca^{2+}]_i$ emelkedéshez vezet. A G_{α_i} -proteinnel csak a VPAC receptorok képesek interakcióba lépni. A PLD aktivitást a VPAC receptorok ARF-dependens, míg a PAC1 receptor PKC-függő útvonalakon keresztül serkentik. EC: extracelluláris tér, IC: intracelluláris tér, PIP_2 : foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát, IP_3 : inozitol-triszfoszfát, PKC: protein kináz C, PKA: protein kináz A, PLD: foszfolipáz D, PC: foszfatidil-kolin, ARF: ADP-ribosilációs faktor, DAG: diacilglicerol, cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát, AC: adenil-cikláz, ATP: adenzin-triszfoszfát, PA: foszfatidsav, PC: foszfatidil-kolin, ER: endoplazmatikus retikulum.

3.3.3 A PACAP receptor agonisták és antagonisták

A PAC1 és VPAC receptorokon számos agonistát és antagonistát azonosítottak, melyek a PACAP receptorok vizsgálatára alkalmas farmakológiai eszközök (1. táblázat). Nagyszámú kísérletben igazolták, többek között humán *neuroblastoma* NB-OK-1 sejteken végzett vizsgálatokkal, hogy a PACAP6-38 potens PAC1/VPAC2 receptor antagonistája (Robberecht és mtsai., 1992). A PACAP6-38 gátolta a PACAP agykérgi neuronokra kifejtett neuroprotektív (Shintani és mtsai., 2005), valamint az érzőneuronok differenciálódását serkentő hatását (Nielsen és mtsai., 2004). Ezzel szemben, érdekes módon az antagonistája bizonyos sejtekben, szövetekben a PACAP1-38-al megegyező hatásokat közvetített. Kutatócsoportunk bizonyította, hogy a PACAP6-38, a PACAP1-38-hoz hasonlóan csökkentette az elektromos téringerléssel, illetve kémiai stimulációval kiváltott szenzoros neuropeptid felszabadulást izolált patkány trachea érzőideg-

végződéseiből. A PACAP6-38 a MAPK jelátviteli útvonalakat *cytothrophoblast* sejtekben a PACAP1-38-al megegyezően befolyásolta. (Németh és mtsai., 2006; Reglődi és mtsai., 2008). A maxadilan egy 61 aminosavból álló potens értágító peptid, melyet homoki légy (*Lutzomyia longipalpis*) nyálmirigyéből izoláltak (Lerner és mtsai., 1991). Annak ellenére, hogy a maxadilan nem mutat nagymértékű szekvencia homológiát a PACAP-pal, PAC1 receptor szelektív agonista. A 25-41 aminosavak eltávolításával kapott maxadilan fragmens a maxadilan 65 (M65) specifikus PAC1 receptor antagonistá. Az M65 szelektíven gátolta a [¹²¹I]PACAP27 kötődését PAC1 receptor-expresszáló CHO sejtvonalon (Uchida és mtsai., 1998). A VIP analóg VIP6-28 VPAC1/VPAC2 receptor antagonistá, parciális agonista hatását is leírták (Schuelert és McDougall, 2006). A VIP szerkezetében a Thr¹¹, Tyr²², Asn²⁸ aminosavak helyettesítése alaninnal egy nagyon szelektív VPAC1 receptor agonista peptidet (Ala^{11,22,28}VIP) eredményezett (Nicole és mtsai., 2000). A 31 aminosavból álló BAY 55-9837 VPAC2 receptor szelektív agonista hatását receptorkötődési vizsgálatokkal bizonyították. A BAY 55-9837 alkalmazása potenciális terápiás lehetőséget jelent a 2-es típusú diabétesz kezelésében (Tsutsumi és mtsai., 2002).

	PAC1	VPAC1	VPAC2
agonista pEC ₅₀	PACAP1-38 7,5-10,3	PACAP1-38 7,4-9,7	PACAP1-38 7,7-9,3
agonista pEC ₅₀	PACAP1-27 7,4-10,6	PACAP1-27 7,6-9,9	PACAP1-27 7,6-9,4
agonista pEC ₅₀	VIP 6-8,4	VIP 7,9-10	VIP 7,3-9,3
szelektív agonista pEC ₅₀	maxadilan 6,2-10,3	Ala^{11,22,28}VIP 7,6-10,2	BAY 55-9837 9,39
antagonista pIC ₅₀		VIP6-28 6,15	VIP6-28 5,52
antagonista pIC ₅₀	PACAP6-38 7,52		PACAP6-38 7,39
szelektív antagonistá pIC ₅₀	M65 6,6-6,8		

1. táblázat: PACAP receptorok farmakológiai jellemzése (Dautzenberg és mtsai., 1999; Dickson és mtsai., 2006; Uchida és mtsai., 1998; Dickinson és mtsai., 1997, Nicole és mtsai., 2000; Gourlet és mtsai., 1998; Tsutsumi és mtsai., 2002 alapján).

3.3.4 A PACAP szerepe migrénben

A PACAP szerepét migrén patomechanizmusában napjainkban intenzíven kutatják, mivel expresszáldódik az emberi és állati agy trigeminális rendszerrel összefüggő számos régiójában, az agytörzs ún. „migrén-generátor” régiójában (Tajti és mtsai., 2001; Christiansen és mtsai., 2003), valamint a *dura mater* hízósejtjeiben (Theoharides és mtsai., 2005). A PACAP és a PAC1 receptor lokalizációját leírták *arteria meningea media* simaizomzatában (Boni és mtsai., 2009). A PACAP és receptorainak jelenlétét kimutatták TRG-n (Nakajima és mtsai., 2013; Tajti és mtsai., 1999), kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok perifériás végződésein és érsimaizomsejteken (Mulder és mtsai., 1994; Fahrenkrug és Hannibal, 1998; Vaudry és mtsai., 2009). A migrénes fájdalom a steril neurogén gyulladás egyik formája (Moskowitz, 1992). Plazma protein extravazációt figyeltek meg patkány TRG elektromos stimulációja során (Markowitz és mtsai., 1987). Újabb kutatások szerint migrénben szenvedő betegekben a PACAP migrénszerű fejfájást okoz (Schytz és mtsai., 2009). Egy másik humán megfigyelés szerint migrénes rohamok alatt a PACAP plazmakoncentrációja megemelkedik (Tuka és mtsai., 2013). Ezek alapján feltételezik, hogy a PACAP fontos mediátor a trigeminovaskuláris aktivációban, mely a migrén patomechanizmusában szerepet játszik (Schytz és mtsai., 2010).

4. CÉLKITŰZÉSEK

A neuropátiás fájdalom, illetve a migrén terápiája nem kielégítő, a rendelkezésre álló hatóanyagok mellékhatásprofilja nem optimális, ezért szükséges elsősorban érzőideg-végződéseken ható gyulladáscsökkentők, fájdalomcsillapítók fejlesztése. Kísérleteinkben különböző *in vitro* módszerekkel célunk volt kulcsmechanizmusok, célmolekulák azonosítása, melyek kiindulópontjai lehetnek új hatásmechanizmusú gyógyszerek fejlesztésének.

Kutatómunkám általános célkitűzései a következők voltak:

I. A lipid raft diszrupció hatásának vizsgálata a TRP receptorok aktiválhatóságára

A TRP receptorok aktivációja szempontjából releváns régiókat azonosították, azonban kevés tudomásunk van arról, hogy a mikrokörnyezet megváltoztatása milyen hatást gyakorol a TRP receptorok működésére. A dolgozatomban részletezett kutatásunk célja annak megállapítása volt, hogy a lipid raft diszrupció hogyan befolyásolja a termoszenzitív TRP receptorok kémiai úton kiváltott aktivációját TRG neuronokon, perifériás érzőideg-végződéseken és TRPV1 receptor-expresszálo CHO sejteken.

II. A hidrogén-szulfid donor vegyületek és a DMTS target molekulájának azonosítása

A TRPA1 receptor szerepe napjainkban kiemelkedő fontosságúvá vált a fájdalomkutatásban. Egyre több agonistát ismerünk meg és számos antagonistát fejlesztenek a receptorműködés gátlására. A H₂S *in vitro* vizsgálatai bizonyították TRPA1 agonista hatását. Célul tűztük ki a DMTS célmolekulájának azonosítását érzőneuronokon.

III. A PACAP receptorokon ható agonisták és antagonisták hatásának vizsgálata

Egyértelművé vált, hogy a PACAP és receptorai a migrén kialakulásában fontos szerepet játszanak. Mivel a trigeminovaskuláris aktivációban részt vevő TRG neuronok vizsgálatáról kevés adat áll rendelkezésünkre, célul tűztük ki a jelenleg ismert agonisták, antagonisták *in vitro* vizsgálatát szenzoros neuronokon. A TRG sejtenyészet transzlációs modellként szolgálhat migrénellenes gyógyszerfejlesztéshez.

5. KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

5.1 Primer sejtenyészet és sejtvonalak

5.1.1 Patkány és egér trigeminális ganglionsejt tenyészet

1-4 napos Wistar patkányok és CD1, TRPA1^{+/+}, TRPA1^{-/-} egerek kétoldali trigeminális ganglionját steril foszfát puffer oldatban (PBS) kipreparáltuk. Az 1 mm³-es gangliondarabokat 35 percig 2 % kollagenáz XI-et (1 mg/ml), ezt követően 8 percen keresztül dezoxiribonukleáz I-et (1000 UN/ml) tartalmazó PBS-ben inkubáltuk (37 °C, 5 % CO₂). A ganglionokat PBS-sel mostuk, majd trituráltuk. Ezután a neuronokat poly-D-lizinnel (100 µg/ml) előkezelt üvegkorongokat tartalmazó, steril 24-lyukú tenyésztőedényekbe helyeztük. A tenyésztő médium összetétele a következő volt: alacsony glükóztartalmú Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 5 % ló szérum, 5 % újszülött kecske szérum, 5 % foetalis borjú szérum, 100 UN/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 200 ng/ml idegi növekedési faktor (NGF). A sejt kultúrákat 37 °C-on, 5% CO₂ jelenlétében tartottuk. A kísérletekhez 1-3 napos tenyészeteket használtunk (Szőke és mtsai., 2000).

5.1.2 TRPV1, TRPA1, PACAP receptor-expresszáló sejtvonalak

A patkány TRPV1 és a humán TRPA1 receptort stabilan expresszáló CHO sejt vonalat Dr. Sándor Zoltán hozta létre egy korábbi közleményében leírt protokollnak megfelelően (Sándor és mtsai., 2005). Vizsgálataink során humán PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptort stabilan expresszáló CHO sejt vonalakat is használtunk (Gaudin és mtsai., 1996; Nicole és mtsai., 2000; Bourgault és mtsai., 2008).

5.2 Vizsgálati módszerek

5.2.1 Intracelluláris Ca²⁺ koncentráció mérés fluoreszcens módszerrel

Az 1-3 napos primer sejtenyészeteket fura-2 acetoxi-metilészter (fura-2 AM) (1 µM) fluoreszcens kalcium indikátor festékkel inkubáltuk (30 perc, 37 °C). Az inkubáló oldat az alábbi összetevőket tartalmazza: 122 mM NaCl, 3,3 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 0,4 mM MgSO₄, 1,2 mM KH₂PO₄; 25 mM HEPES, 10 mM glükóz, pH 7,3. A festék passzív

diffúzióval az intracelluláris térbe jut, ahol az észterázok lehasítják a vegyületről az acetoxi-metilészter csoportot, mely ilyen formában képes lesz a szabad Ca^{2+} megkötésére. A hidrolízist követően a fluoreszcens Ca^{2+} indikátor a membránon nem tud átjutni, az intracelluláris térben marad. A mérés azon az elven alapul, hogy Ca^{2+} -t kötött fluoreszcens festék abszorpciós maximuma (340 nm) különbözik a Ca^{2+} -t nem kötött festékétől (380 nm), így a két abszorpciós maximumnak megfelelő hullámhosszon való gerjesztést követően az emittált fényintenzitások hányadosából a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ meghatározható. A kísérleteket szobahőmérsékleten végeztük Olympus BX50WI fluoreszcens mikroszkóppal. A mérés előtt a sejteket 5 percig extracelluláris oldattal (ECS) mostuk, melynek összetétele a következő: 160 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 10 mM glükóz, pH 7,3. Az ECS-t, illetve a teszt oldatokat 150 μm átmérőjű 3 kifolyónyílású csövön keresztül juttattuk a sejtekre, melynek adagolását egy gyors lépésű perfúziós rendszer biztosította (VC-77SP, Warner Instrument Corporation, Harvard Apparatus GmbH). A fluoreszcens képet egy vízimmerziós objektív (Olympus LUMPLAN FI/x20 0,5 W) és egy számítógéphez csatlakoztatott digitális kamera (CCD, SensiCam PCO) segítségével rögzítettük. A sejtek által felvett fluoreszcens festék 340 és 380 nm hullámhosszú fénnel való alternáló gerjesztését monokromátor biztosította (Polychrome II, Till Photonics, Germany). Az 510 nm-es emittált fényt interferenciaszűrő alkalmazásával fotoelektronsokszorozó segítségével detektáltuk (9. ábra). A két hullámhosszon gerjesztett fluoreszcencia intenzitás arányát, az ún. ratiómetrikus értéket ($R = F_{340}/F_{380}$) az idő függvényében Axon Imaging Workbench 2.2 szoftverrel generáltuk. Az eredmények értékelését Microcal Origin 7.0 szoftverrel (Originlab Corp. Northhampton, USA) végeztük. A sejtmentes területekről nyert adatok felhasználásával háttérlevonást végeztünk. A sejtekben ECS áramoltatása folyamán detektált ratiómetrikus értéket tekintettük $R=0$ értéknek, ehhez viszonyítottuk a tesztoldatok adása folyamán mért R_{max} értékeket.



9. ábra: Intracelluláris Ca^{2+} koncentráció mérőrendszer.

A lipid raft diszrupció hatását TRG neuronokon vizsgáltuk ezzel a módszerrel. A tenyészeteken MCD (1; 3; 10 mM, 45 perc, 37 °C) szfingomielináz (10; 30 mUN, 60 perc, 37 °C), ceramid /szfingozin (10 μM , 60 perc, 37 °C) illetve myriocin (200 nM, egy éjszakán át, 37 °C) kezelést alkalmaztunk 5%-os CO_2 tartalom mellett. A kísérlet során a TRPV1 (330 nM kapszaicin), TRPA1 (200 μM AITC, 0,01% formaldehid), TRPM8 (1 μM icilin) és TRPM3 (50 μM pregnenolon-szulfát) receptor agonistákat alkalmaztuk. A PACAP receptor agonisták és antagonisták vizsgálatát patkány és egér TRG neuronokon, valamint PACAP receptor-expresszálo CHO sejteken végeztük. Wistar patkány TRG neuronokon az alábbi anyagokat alkalmaztuk: PACAP1-38, PACAP6-38 (10; 30; 100; 500 nM és 1 μM), VIP, Ala^{11,22,28}VIP, BAY 55-9837, maxadilán (100; 500 nM), VIP6-28 (1 μM), PACAP1-27 (100; 300 nM; 1 μM), M65 (300; 500 nM). CD1 egér TRG sejteken 100 nM koncentrációban vizsgáltuk a PACAP1-38, PACAP6-38, maxadilán, VIP, Ala^{11,22,28}VIP, BAY 55-9837 hatását, VIP esetében 500 nM koncentrációt is használtunk a mérés során, az M65 alkalmazott koncentrációja 300 nM volt. PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptor-expresszálo sejtvonalakon tesztelt peptidek: PACAP1-38, PACAP6-38, maxadilán, Ala^{11,22,28}VIP, BAY 55-9837 (100 nM), M65 (300 nM).

A hidrogén-szulfid donor és poliszulfid vegyületeket, NaHS (230 μ M; 2,1 mM), Na₂S (140; 350 μ M), DMTS (100 μ M) TRPA1 génhiányos (TRPA1^{-/-}) és vad típusú (TRPA1^{+/+}) egér TRG sejteken teszteltük.

5.2.2 Radioaktív ⁴⁵Ca²⁺ felvétel vizsgálatok sejtvonalakon

Az kalcium izotóppal végzett kísérletek kivitelezését Wood és munkatársai 1988-as publikációja alapján végeztük (Wood és mtsai., 1988). A mikrofluorimetriás kísérletek hátránya, a sejtes válaszok nagymértékű heterogenitása kerülhető el ezzel a technikával, mely egyszerre képes több ezer sejt együttes reakcióját *count per minute* (CPM) értékben detektálni. A sejteket 72-lyukú mini tenyésztőedénybe helyeztük (Microwell Minitrays, Sigma), mely 15 μ l-es térfogatban tartalmazott DMEM tápoldatot (kb. 4000 sejt/lyuk). Másnap a letapadt klónsejteket ötször mostuk Ca²⁺ mentes Hank's oldattal (100 mM NaCl, 5 mM HEPES, 5 mM KCl, 4 mM NaHCO₃, 10 mM glükóz, 30 mM NaH₂PO₄·H₂O, 30 mM KH₂PO₄, pH 7,4). Ezt követően 10 μ l Ca²⁺ mentes Hank's oldatban oldott tesztoldat és 200 μ Ci/ml ⁴⁵Ca²⁺ izotóp (1,3 Ci/mM, Ammersham) elegyében 2 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk a sejteket. Az ötszöri ECS oldattal történő mosást követően a sejteket tartalmazó mini tenyésztőedényt kiszáritás céljából 75 °C-ra helyeztük, majd 15 μ l 0,1%-os nátrium-dodecil-szulfáttal (SDS) lizáltuk a sejteket, hogy az általuk akkumulált ⁴⁵Ca²⁺ izotópot összegyűjtsük. A lizátum radioaktivitását 2 ml szcintillációs folyadékban Packard Tri-Carb 2800 TR számlálóval mértük. A ⁴⁵Ca²⁺ izotóp retenciót CPM értékben adtuk meg.

A lipid rafttal kapcsolatos vizsgálatokhoz a TRPV1 receptor-expresszálo CHO sejteket a kapszaicin (330 nM) alkalmazása előtt ceramiddal (1; 10 μ M), illetve szfingozinnal (1; 10 μ M) kezeltük (37 °C, 60 perc), illetve maradtak kezeletlen kontrolllok.

A PACAP receptor agonisták és antagonisták tesztelése esetén a PAC1, VPAC1, VPAC2 és TRPV1 receptor-expresszálo CHO sejtvonalakon az alábbi tesztoldatokat alkalmaztuk: kapszaicin (100 nM), PACAP1-38 (100 nM) és PACAP6-38 (1 μ M).

5.2.3 [³⁵S] Guanozin-5'-O-[γ -tio] trifoszfát ([³⁵S]GTP γ S) kötődési teszt

A módszer a G-protein-kapcsolt receptor aktiváció vizsgálatára alkalmas. A [³⁵S]GTP γ S nem hidrolizálható γ -foszfátcsoporton ³⁵S izotópot tartalmazó radioaktív GTP analóg. A teszt működése a receptoraktiváció folyamán bekövetkező guanozin-5'-difoszfát (GDP)→[³⁵S]guanozin-5'-O-[γ -tio] trifoszfát ([³⁵S]GTP γ S) átalakuláson alapul. A

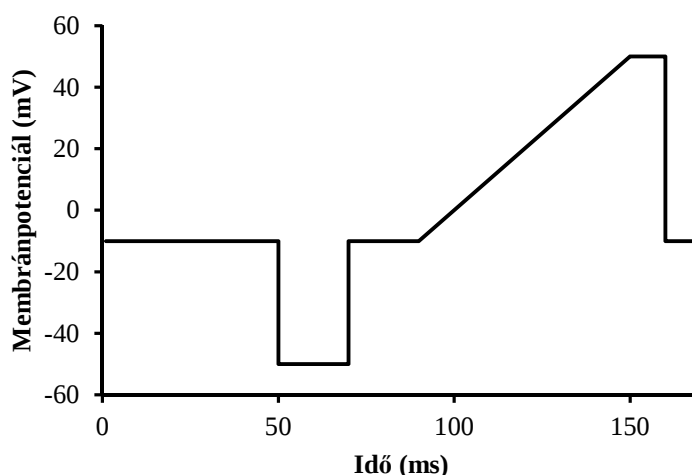
membránhoz kötött jelölt GTP analóg radioaktivitását mérjük. A PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptor-expresszáló CHO sejteket homogenizáltuk és 50 mM trisz-(hidroximetil)-aminometán-hidroklorid (Tris-HCl) pufferrel (pH 7,4) hígítottuk az optimális proteintartalom eléréséig (10 µg protein/minta). A membránfrakciókat trisz-etilén-glikol-tetraecetsav (Tris-EGTA) pufferben (50 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 3 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, pH 7,4) inkubáltuk (30 °C, 60 perc), mely 20 MBq/0,05 ml [³⁵S]GTPγS-t (0,05 nM), emelkedő koncentrációjú PACAP1-38, PACAP6-38, VIP, VIP6-28, maxadilan, M65, Ala^{11,22,28}VIP, BAY 55-9837 (0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 nM és 1 µM) oldatot és 30 µM GDP-t tartalmazott 1 ml végtérfogatban. A membránhoz kötött és nem kötött [³⁵S]GTPγS-t a minták Whatman GF/B filteren való vákuumszűrésével különítettük el. A filtereket 48-lyukú Slot Blot szűrőbe fogtuk, ezen keresztül a mintákat háromszor mostuk 5 ml jéghideg Tris-HCl pufferrel (50 mM, pH 7,4). A filterpapír száradása után (60 perc, 37 °C) a membránfrakciókat tartalmazó filterdarabokat kivágtuk, UltimaGold F szcintillációs folyadékba helyeztük, a radioaktivitást Packard Tri-Carb 2800 TR szcintillációs számlálóval mértük. A nem-specifikus kötődést 10 µM jelöletlen GTPγS jelenlétében, a teljes kötődést a tesztanyag hiányában határoztuk meg. A specifikus kötődés a teljes kötődés és a nem-specifikus kötődés különbségéből számolható. A tesztanyagok által indukált G-protein aktivációt a ligandum hiányában megfigyelt specifikus [³⁵S]GTPγS kötődés százalékában adtuk meg (Bojnik és mtsai., 2009).

5.2.4 Patch-clamp módszer

A méréseket a TRPA1 receptor génjével stabilan transzfektált CHO sejtvonalon végeztük. A sejteket 37 °C-on, 5% CO₂ szint mellett alacsony glükóztartalmú DMEM médiumban tenyésztettük, kiegészítve 10% foetalis borjú szérummal, nem esszenciális aminosavakkal, penicillinnel (100 UN/ml), streptomycinnel (100 µg/ml), L-glutaminnal (4 mM). A médium emellett tartalmazott G418-at 500 µg/ml koncentrációban. A tenyésztési folyamat során a konfluencia szint nem haladta meg a 40-50%-ot. A méréseket sejtszuspenzióon végeztük, melynek előállításához a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd TrypLE rekombináns enzimet pipettáztunk rájuk. A felesleges enzimet azonnal leöntöttük, az emésztést a megmaradt vékony filmrétegben 2 percig szobahőmérsékleten végeztük, majd 1-2 ml külső oldatban reszuszpéndáltuk a sejteket. Az így kapott sejtszuspenzió 1-2 órán át alkalmas automata patch-clamp vizsgálatokhoz.

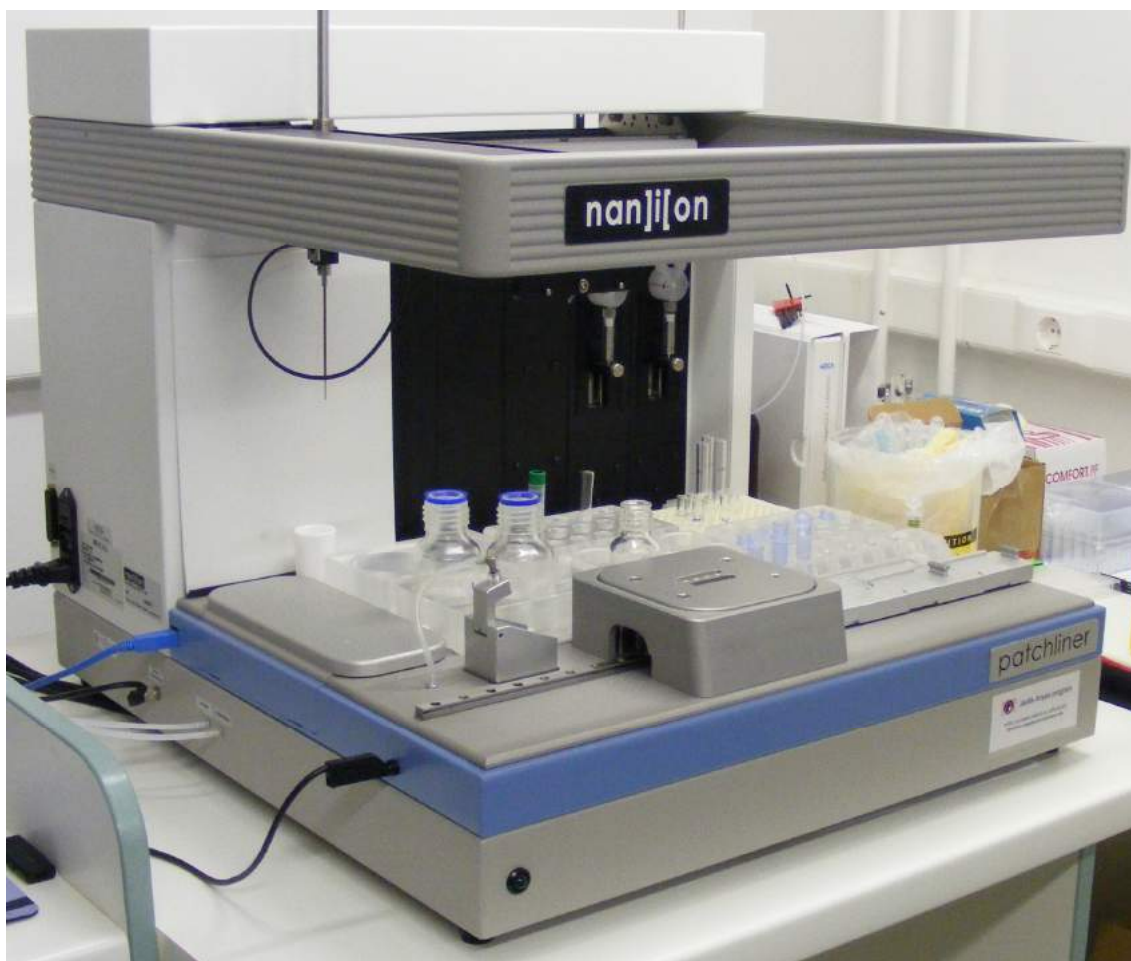
A patch-clamp méréseket szobahőmérsékleten planár technikával végeztük, whole-cell konfigurációban négycsatornás Patchliner (Nanion Technologies GmbH, München, Németország) berendezéssel (11. ábra). A patch-clamp mérésekhez használt külső és belső oldatokat steril szűrés után -20 °C-on tároltuk és közvetlenül a mérések előtt melegítettük fel szobahőmérsékletűre. A patch-clamp mérések során az alábbi oldatokat használtuk: belső oldat: 10 mM CsCl, 110 mM CsF, 20 mM EGTA, 10 mM HEPES, 0,3 mM Na-GTP és 5 mM Na-ATP (pH 7,2), külső oldat: 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 5 mM D-glükóz-monohidrát, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl₂ and 3 mM CaCl₂ (pH 7,4), mérő oldat: 140 mM N-metil-D-glukamin (NMDG)-Cl, 15 mM BaCl₂, 15 mM NMDG-EGTA and 10 mM HEPES (pH 7,4) összekeverve 240 mM szorbitollal 1:2 arányban.

A méréshez alkalmazott pulzusprotokoll egy 20 ms-ig tartó -50 mV-os lépéssel indul, amely után 20 ms hosszan visszatérünk a -10 mV-os nyugalmi potenciálra. Ezután 60 ms hosszú ramp protokoll alkalmazásával elérjük az 50 mV-os membránpotenciált. A sejteket 10 ms-ig tartottuk az 50 mV-os potenciálon, majd visszatértünk a -10 mV-os nyugalmi membránpotenciálra (10. ábra). A pulzusfrekvencia 0,2 Hz volt.



10. ábra: Feszültségprotokoll.

A sejtek reszuszpendálása, a seal és a whole-cell konfiguráció létrehozása a normál külső oldatban történt. Ezután a külső oldatot lecseréltük a mérőoldatra. A kontroll szakasz után a mérőoldatban oldott DMTS-t pipettáztuk a sejtekre növekvő koncentrációban. Minden koncentráció 2 percig volt a sejteken. A feszültségprotokoll alkalmazása során 50 mV-on meghatároztuk az áram nagyságát. Az értékek korrigálásra kerültek a kontroll mérésekkel. A két érték különbségét tekintettük a TRPA1 csatornán átfolyó áramnak.



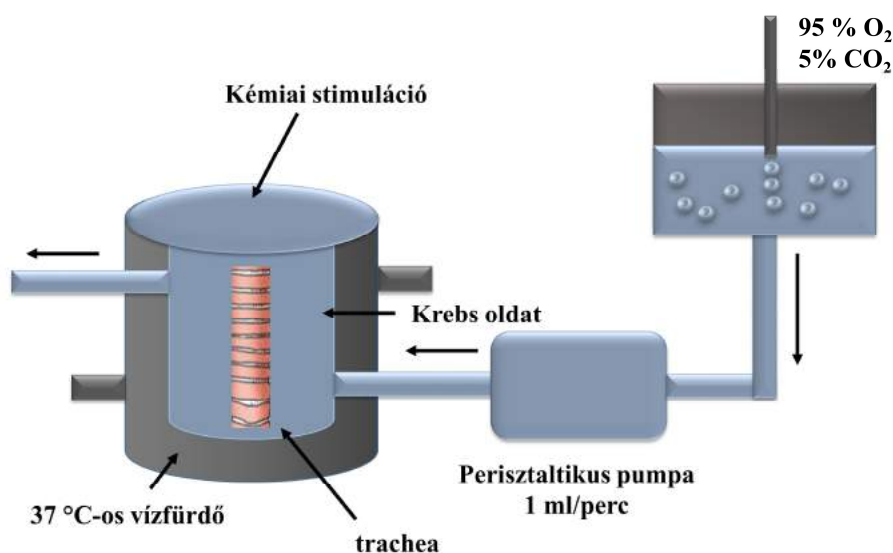
11. ábra: Automata patch-clamp rendszer (Patchliner, Nanion).

5.2.5 CGRP felszabadulás mérése radioimmunoassay (RIA) módszerrel izolált patkány trachea érzőideg-végződéseiből

A *trachea* a szenzoros neuropeptid felszabadulás mérésére kiválóan alkalmas modellszerv, mivel nagyon gazdag kapszaicin-érzékeny innervációval rendelkezik, az érzőideg-végződések könnyen stimulálhatók, mivel közel vannak a felszínhez, könnyen stimulálhatók. A patkány *tracheákat* thiopentállal (50 mg/kg i.p.) történő altatás mellett az állatok kivéreztetését követően kipreparáltuk, megtisztítottuk a zsírtól és a kötőszövettől. Az izolált légcsöveket 37 °C-on temperált, oxigenizált Krebs oldattal (pH 7,4) 60 perces ekvilibrációs periódus alatt perfundáltuk (2-2 szerv/1,8 ml szervfürdő) (12. ábra). A lipid raft diszrupció hatásának vizsgálatához a tracheákat 10 perc Krebs oldattal történő perfundálást követően 30 percig szfingomielináz (5; 10 mUN)/ceramid (10 μ M)/szfingozin (10 μ M) jelenlétében inkubáltuk, majd ismételt Krebs oldat áramoltatás (20 perc) következett. Az áramlás leállítása után 8 percenként lecserélve a kamrában lévő oldatokat prestimulációs, stimulációs és posztstimulációs fázisokat nyertünk. Az ingerlés

előtti bazális CGRP felszabadulást az első 8 perces frakcióból határoztuk meg. A második 8 perces szakaszban (ingerelt frakció) történt a *trachea* afferens idegvégződéseinek stimulációja kémiai úton kapszaicinnel (100 nM), illetve AITC-vel (100 μ M). A harmadik periódusban (ingerlés utáni frakció) nem történt ingerlés, ez a frakció az ingerlés utóhatásaként jelentkező CGRP felszabadulást adta meg.

A szervfürdőkből vett 200 μ l térfogatú mintákból RIA módszer segítségével határoztuk meg a CGRP koncentrációkat. A neuropeptid mennyiségét fmol/mg nedves szövetsúlyra vonatkoztatva fejeztük ki (Németh és mtsai., 1996, Helyes és mtsai., 1997; Németh és mtsai., 1998; Helyes és mtsai., 2001). Az ingerlés hatására felszabadult teljes CGRP mennyiséget úgy számoltuk, hogy a stimulációs és posztstimulációs fázisokban mért CGRP koncentráció értékekből levontuk a bazális értéket és a kapott számokat összeadtuk. A szfingomielináz hatásának vizsgálatához a CGRP koncentrációkat kémiai stimuláció alkalmazása nélkül is meghatároztuk.



12. ábra: Trachea perfúziós rendszer vázlata.

5.2.6 Fluoreszcencia spektroszkópia

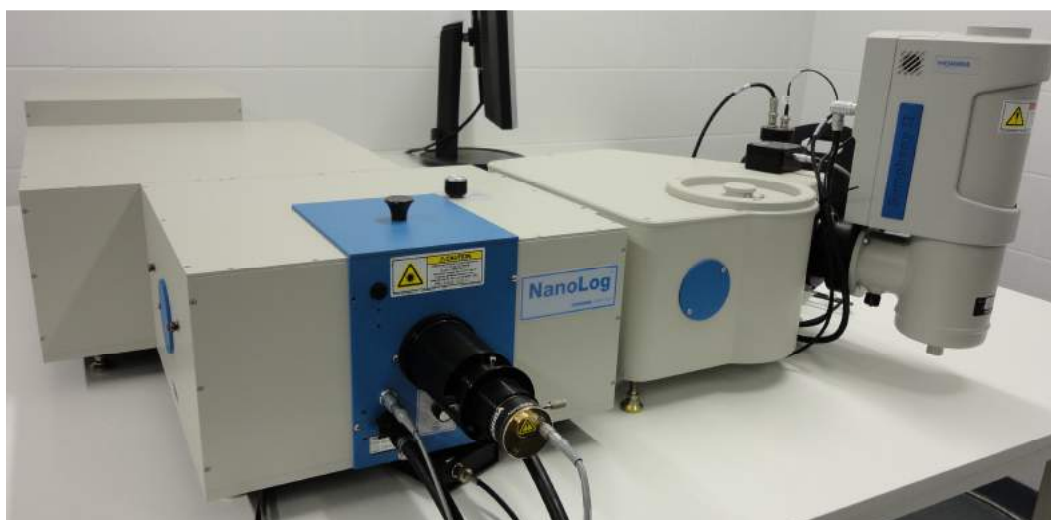
A membrán struktúrák vizsgálatának széles körben alkalmazott módszere a laurdan fluoreszcencia emissziójának detektálása, melyet mind modell membránok, mind élő sejtek esetében használnak (Harris és mtsai., 1996, Gaus és mtsai., 2003). A módszer a membrán rendezett (kontroll) és rendezetlen (MCD-kezelt) fázisai közötti különbség kimutatásán alapul (Golfetto és mtsai., 2013). A membrán különböző fázisú doménjeinek megoszlását laurdan segítségével detektáltuk, melynek gerjesztési és emissziós

spektrumát a membrán aktuális hidratáltsági szintje befolyásolja. A lipid raft diszrupció eléréséhez a TRG neuronokat 10 mM MCD-vel kezeltük (45 perc, 37 °C), a kontroll sejteket PBS-ben inkubáltuk. A tenyészeteket 1 µM laurdan oldattal jelöltük (40 perc, 37 °C), majd membránpreparátumot készítettünk. A méréseket FL3-2iHR spektrofluoriméterrel (HORIBA Jobin-Yvon NanoLog) 4 mm-es kvarcküvetákban (Hellma 104F-QS) végeztük (13. ábra). A vizsgált minta hőmérsékletét 20 °C-ra állítottuk cirkulációs vízfürdő (AC200-A25) segítségével. Az általánosított polarizáció széles körben alkalmazott módszer a spektrális eltolódások jellemzésére (Sanches és mtsai., 2007). Értéke definiálható emissziós és gerjesztési spektrumok esetén egyaránt. Az emissziós spektrum felvétele során a laurdant 360 nm-en gerjesztettük és emisszióját 380 és 600 nm közti tartományban vettük fel. Az emissziós spektrum általánosított polarizációját az alábbi képlettel számoltuk:

$$GP_{Em} = \frac{I_{435} - I_{500}}{I_{435} + I_{500}}$$

Magasfokú membrán rendezettség csökkenti a poláros környezet miatti vörös eltolódás mértékét a laurdan emissziós spektrumában, mely a képlet alapján a GP növekedését eredményezi. A gerjesztési spektrum felvétele során a laurdan emisszióját 432 nm-en mértük. A gerjesztési hullámhossz 300 és 420 nm között változott. A laurdan gerjesztési spektrumának általánosított polarizációját az alábbi képlettel számoltuk:

$$GP_{Ex} = \frac{I_{410} - I_{340}}{I_{410} + I_{340}}$$



13. ábra: A spektrofluoriméter (HORIBA Jobin-Yvon NanoLog) felépítése.

5.2.7 Filipin fluoreszcens jelölés

Az MCD által okozott koleszterin depléción nyomon követésére koleszterin-kötő fluoreszcens festéket alkalmaztunk a makrofágokon leírt protokoll szerint (Tabas és mtsai., 1994). Poly-D-lizinnel kezelt üvegkorongokra kitapadt TRPV1 receptor-expresszáló CHO sejteket és TRG neuronokat 10 mM MCD-vel kezeltük (45 perc, 37 °C). A kezeletlen kontrollokat azonos körülmények között ECS-ben inkubáltuk. A sejtenyészeteket PBS-sel mostuk, majd 4% formaldehiddel fixáltuk 1 órán át szobahőmérsékleten. PBS-sel történő mosást követően glicin oldat (1,5 mg/ml) került a sejtekre 10 percre, melyet filipin oldattal (0,05 mg/ml PBS/10% FBS oldatban) való inkubálás követett 2 órán keresztül. A sejteket háromszor mostuk PBS-sel, majd Olympus Fluoview-1000 rendszerrel analizáltuk (14. ábra). A fluoreszcens képet Olympus IX81 fluoreszcens mikroszkóphoz csatlakoztatott Olympus DP70 digitális kamerával rögzítettük. A felvételek felbontása 4080x3072 pixel, az ISO érték 200. A vizsgálat során használt objektív: Olympus UPlanFL N 40x/0,75 Ph2 UIS 2. A gerjesztés higany lámpával, DAPI (Hoechst/AMCA): ex 335-375, em 440-500 szűrővel történt.



14. ábra: Az Olympus Fluoview-1000 rendszer felépítése.

5.3 Anyagok

A kísérleteinkhez az alábbi anyagokat használtuk: formaldehid (Molar Chemicals Ltd., Hungary), icilin, pregnenolon-szulfát, MCD, szfingomielináz *Bacillus cereus*-ból, KCl, NaHS, Na₂S (Sigma-Aldrich, Magyarország), Ala^{11,22,28}VIP, BAY 55-9837 (Tocris Bioscience, Egyesült Királyság). AITC, kapszaicin, kapszazepin, laurdan (Sigma-Aldrich, Magyarország) és HC-030031 (Tocris Bioscience, Egyesült Királyság) esetében 10 mM-os, a Filipin III *Streptomyces filipinensis*-ből (Sigma-Aldrich, Magyarország) esetében 1 mg/ml-es törzsoldatot készítettünk DMSO (Sigma-Aldrich, Magyarország) felhasználásával. A DMTS-t (Sigma-Aldrich, Magyarország) 1 M-os koncentrációban DMSO-ban oldottuk, majd 100 mM koncentrációig hígítottuk 2% Tween80-at tartalmazó fiziológiás sóoldattal. A myriocint (Sigma-Aldrich, Magyarország) metanolban oldottuk 10 mM koncentrációban, míg a 10 mM-os ceramid és a szfingozin (Sigma-Aldrich, Magyarország) törzsoldathoz kloroform:metanol=9:1 arányú elegyét használtuk. A PACAP1-38, a PACAP6-38, a PACAP1-27, a maxadilan és az M65 előállítását a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Kémia Intézetében szilárd fázisú peptid szintézis módszerével, Fmoc-védőcsoport stratégiát alkalmazva CEM Liberty automata peptid szintetizáló berendezéssel (CEM Liberty® Microwave Peptide Synthetiser) történt. Az anyagok oldószere a kísérleti elrendezéstől függően ECS (intracelluláris Ca²⁺ koncentráció mérés), Ca²⁺ mentes Hank's oldat (⁴⁵Ca²⁺ felvétel vizsgálatok) vagy Krebs oldat (CGRP felszabadulás mérés perifériás érzőideg-végződésekből) volt.

A sejtenyésztéshez használt anyagok: kollagenáz IX, dezoxiribonukleáz I, poly-D-lizin, NGF, penicillin, streptomycin, DMEM (Sigma-Aldrich, Magyarország), ló szérum, foetalis borjú szérum, újszülött kecske szérum (Gibco, Grand Island, NY, USA), PBS (Life Technologies, Magyarország), TrypLE (ThermoFisher). A fura-2 AM (Life Technologies, Magyarország) fluoreszcens festéket DMSO-ban oldottuk 1 mg/ml koncentrációban. A [³⁵S]GTPγS kötődési tesztben alkalmazott anyagok: GDP, GTPγS, (Sigma-Aldrich, Magyarország), [³⁵S]GTPγS (Izotóp Intézet, Budapest), Tris-EGTA (Reanal, Magyarország).

5.4 Statisztikai analízis

Az adatokat átlag $\pm$ SD, illetve $\pm$ SEM értékekben adtuk meg, melyek legalább három független kísérlet eredményeiből származtak. A PACAP analógok vizsgálata esetén egyutas ANOVA, Bonferroni post hoc tesztet vagy kétmintás t-próbát, míg a lipid raft diszruptió hatásának elemzéséhez egyutas ANOVA, Dunnett post hoc tesztet vagy kétmintás t-próbát használtunk. Minden esetben a $p < 0.05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Az EC_{50} értékeket 4 pontos dózis-hatás görbe alapján határoztuk meg Graph Pad Prism 5.0 szoftver segítségével. Patch-clamp vizsgálatokhoz a dózis-hatás görbe illesztésére, illetve az EC_{50} érték meghatározására a SigmaPlot programot használtuk.

5.5 Etikai vonatkozások

A tenyészállatok tartása a PTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetének Állatházában valósult meg 24-25 °C-on, normál étellel és vízzel korlátlanul ellátva. Kísérleteink minden esetben megfelelnek az állatok védelmére és kíméletére vonatkozó, 1998/XXVIII. számú törvény, valamint az állatkísérletek végzésére vonatkozó 243/1988. kormányrendelet előírásainak. Vizsgálatainkat jóváhagyta a Pécsi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága.

6. EREDMÉNYEK

6.1 A lipid raft diszrupció hatása a TRP receptorok aktiválhatóságára

6.1.1 Szfingomielináz kezelés hatása a TRP receptorok működésére TRG neuronokon

Patkány TRG sejtenyészeten a TRP receptor aktivációt fluoreszcens $[Ca^{2+}]_i$ méréstechnikával detektáltuk. Kvantitatív értékelésre a Ca^{2+} válaszok maximum értékét használtuk. A reagáló sejteket a fluoreszcencia arány érték növekedése ($R \geq 0,1$) alapján azonosítottuk. A kapszaicin alkalmazása 2-5 s-ig tartott, mely azonban a válaszok kinetikai jellemzői és időtartama szempontjából jelentős eltéréseket okozott. Hasonló gyakorisággal észleltünk rövid tranziens, valamint egy kezdeti gyors fázist követő hosszú platófázissal rendelkező választípusokat. Az AITC válasz jellemzően hosszú latencia után (15-30 s) fejlődött ki. A formaldehid hatására jelentkező $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés szintén nagyobb latencia után jelentkezett (15-20 s) és a regisztrált görbe alakja az AITC válasz kinetikai jellemzőit mutatta. A plazmamembrán szfingomielin tartalmának depletálásához szfingomielinázzal (10; 30 mUN) inkubáltuk a tenyészeteket (60 perc, 37 °C).

Kutatócsoportunk korábbi kísérletei igazolták, hogy a kapszaicin által kiváltott TRPV1, illetve az AITC-indukált TRPA1 receptor aktivációt a szfingomielináz kezelés koncentrációfüggő módon gátolta. Ezen megfigyeléseket kiegészítettük jelen vizsgálatunkban további kísérletekkel, több sejt bevonásával. Kontroll tenyészeteken a vizsgált neuronok $61,46 \pm 4,9\%$ -a válaszolt kapszaicinre. A 30 mUN szfingomielináz előkezelés szignifikánsan csökkentette a kapszaicin-érzékeny sejtek arányát ($40,36 \pm 4,6\%$), míg a 10 mUN enzimmel történő inkubáció nem okozott szignifikáns mértékű gátlást, a sejtek $57,18 \pm 3,7\%$ -a válaszolt az agonistára (15. A ábra).

A TRPA1 receptor agonista AITC-szenzitív sejtek aránya $26,1 \pm 2,8\%$ volt, míg formaldehidre a neuronok $38,6 \pm 3,36\%$ -a válaszolt. Az AITC és a formaldehid receptor szelektivitásának meghatározása céljából további farmakológiai vizsgálatokat végeztünk. A szelektív TRPA1 antagonistá HC-030031 (50 μ M) gátolta az AITC hatására kialakult Ca^{2+} szignálokat. A formaldehid hatását a szelektív antagonistá azonban csak részben gátolta, a raciométrikus értékeket redukálta, azonban a sejtek jelentős részében $[Ca^{2+}]_i$ növekedést detektáltunk. A formaldehid válaszokat a HC-030031 (50 μ M) és a TRPV1 antagonistá kapszazepin (10 μ M) együttes alkalmazása törölte el. A szfingomielináz

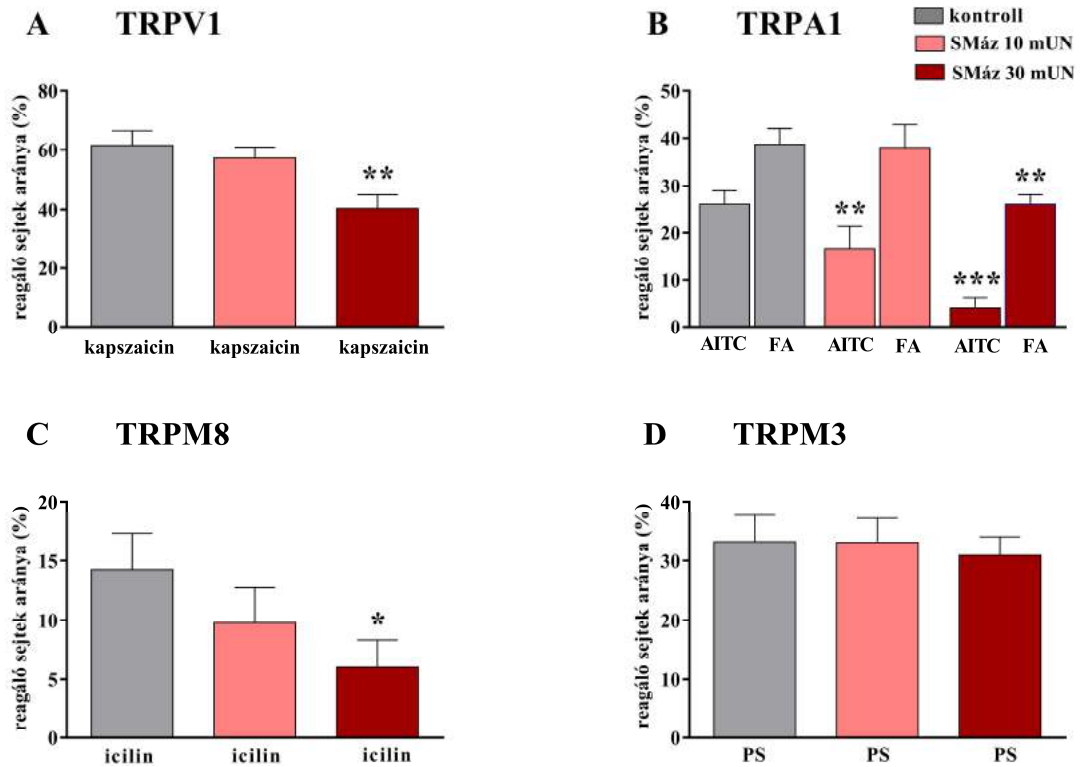
kezelés szignifikánsan csökkentette az AITC-érzékeny sejtek arányát, $16,67 \pm 4,7\%$ -ra 10 mUN, illetve $3,99 \pm 2,1\%$ -ra 30 mUN koncentrációk alkalmazásakor. A formaldehid válaszokat azonban csak a 30 mUN enzimmal történő kezelés gátolta ($26,1 \pm 2\%$). Az alacsonyabb koncentrációban alkalmazott szfingomielináz (10 mUN) nem okozott szignifikáns csökkenést a formaldehid-szenzitív neuronok arányában, a kezelés után formaldehidre a sejtek $37,97\% \pm 4,8$ -a válaszolt (15. B ábra).

A kapszaicin, az AITC és a formaldehid hatására detektált fluoreszcencia arányértékek ($R=1,06 \pm 0,32$, $R=0,71 \pm 0,22$, $R=0,49 \pm 0,12$) szfingomielináz (30 mUN) kezelést követően szignifikánsan csökkentek ($R=0,40 \pm 0,13$, $R=0,31 \pm 0,12$, $R=0,27 \pm 0,11$) (16. ábra).

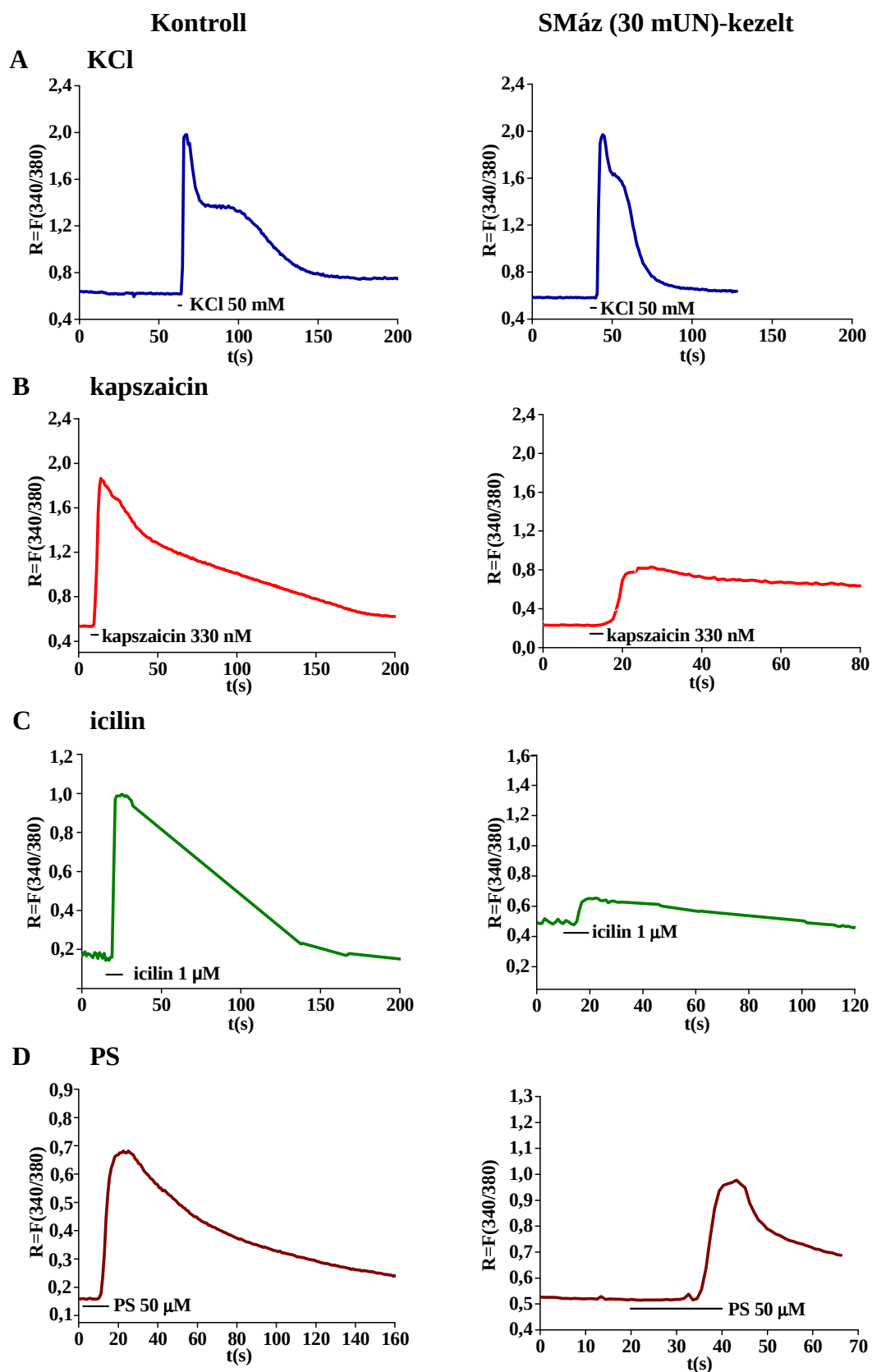
A racimetrikus értékek csökkenése mellett a Ca^{2+} szignálok latenciaideje is változott a kezelés hatására. Kontroll sejtekben az AITC válasz $18,46 \pm 4,75$ s után fejlődött ki. A szfingomielináz (10; 30 mUN) kezelés megnyújtotta a válaszok latenciaidejét ($20,4 \pm 5,11$ s, $38,1 \pm 4,1$ s) (17. ábra).

Kísérleteink második fázisában az icilinre (1 μ M) reagáló neuronok arányát határoztuk meg kontroll sejteken ($14,23 \pm 3,1\%$, 14/98). Az icilin válasz rövid latencia (5-10 s) után jelentkezett. A 30 mUN szfingomielináz kezelés szignifikánsan csökkentette az icilin-érzékeny sejtek arányát ($6,02 \pm 2,3\%$, 5/85), míg a 10 mUN enzimmal történő inkubációt követően a sejtek $9,8 \pm 2,9\%$ -a (11/97) reagált a TRPM8 agonistára (15. C ábra).

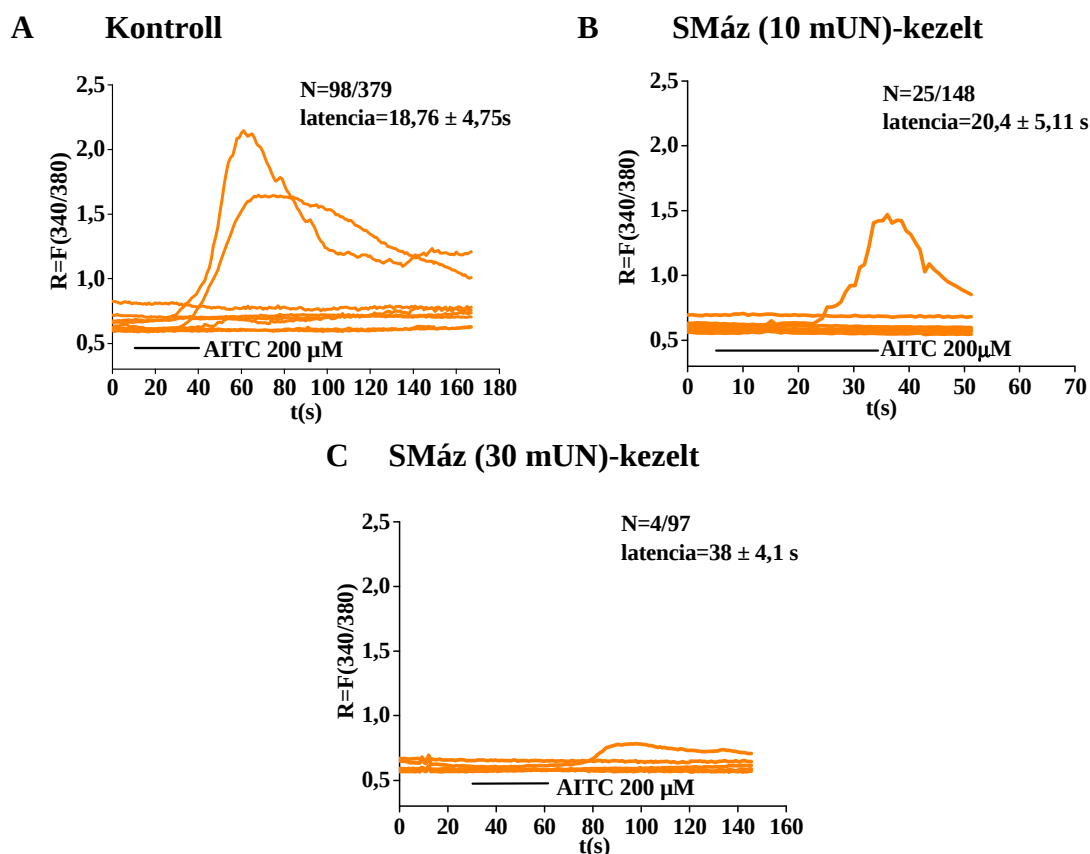
A továbbiakban vizsgáltuk a szfingomielináz hatását a pregnenolon-szulfát-indukált TRPM3 receptor aktivációra. A pregnenolon-szulfát által kiváltott Ca^{2+} szignál hosszabb latencia (20-30 s) után fejlődött ki. Az icilin esetében kapott eredményekkel ellentétben, a kezelés nem csökkentette szignifikánsan a pregnenolon-szulfátra (50 μ M) reagáló sejtek arányát, mely értékek kontroll körülmények között $33,25 \pm 4,5\%$ (43/127), míg szfingomielinázzal (10; 30 mUN) kezelt tenyészeteken $33,11 \pm 4,2\%$ (28/79), illetve $30,89 \pm 3,2\%$ (21/67) voltak (15. D ábra).



15. ábra: Szfingomielináz kezelés hatása TRPV1, TRPA1, TRPM3 és TRPM8 receptorok aktiválhatóságára TRG neuronokon. (A) Kapszaicin-érzékeny kontroll és szfingomielináz-kezelt (10; 30 mUN) neuronok aránya (%), N=53-67 sejt/csoport. (B) AITC- és formaldehid-szenzitív kontroll és szfingomielináz-kezelt (10; 30 mUN) neuronok aránya (%), N=80-379 sejt/csoport. (C) Icilin-érzékeny kontroll és szfingomielináz-kezelt (10; 30 mUN) neuronok aránya (%), N=85-98 sejt/csoport. (D) pregnenolon-szulfát érzékeny kontroll és szfingomielináz-kezelt (10; 30 mUN) neuronok aránya (%), N=67-127 sejt/csoport. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ kontroll vs. szfingomielináz-kezelt csoport, egyutas ANOVA, Dunnett post hoc teszt). Az oszlopok az átlag $\pm$ SD értékeket reprezentálják. SMÁz: szfingomielináz, PS: pregnenolon-szulfát, FA: formaldehid, AITC: allilizotiocianát.



16. ábra: Szfingomielináz kezelés hatása TRPV1, TRPA1, TRPM3 és TRPM8 receptorok aktiválhatóságára és a feszültségfüggő kalcium csatornák működésére TRG neuronokon. Az $R=F(340/380)$ érték változása fura-2 AM-mel feltöltött neuronokban. Eredeti regisztrátumok (A) KCl-, (B) kapszaicin-, (C) icilin- és (D) pregnenolon-szulfát-szenzitív sejtekről kontroll és szfingomielináz-kezelt (30 mUN) tenyészeteken. SMáz: szfingomielináz, PS: pregnenolon-szulfát.

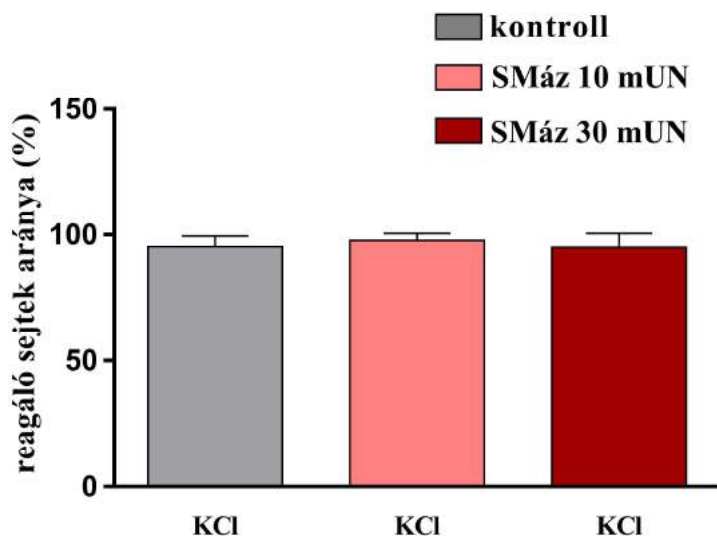


17. ábra: Szfingomielináz kezelés hatása a TRPA1 receptor aktivációt követő Ca^{2+} szignálok kinetikai jellemzőire TRG neuronokon. Az $R=F(340/380)$ érték változása fura-2 AM-mel feltöltött neuronokban. Eredeti regisztrátumok (A) kontroll (B) 10 mUN szfingomielináz-kezelt és (C) 30 mUN szfingomielináz-kezelt neuronokon. SMáz: szfingomielináz, AITC: allilizotiocianát.

6.1.2 Szfingomielináz kezelés hatása a feszültségfüggő kalcium csatornák működésére és a belső membránok szerkezeti integritására TRG neuronokon

KCl-indukált $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedést a kontroll sejtek $95,24 \pm 4,2\%$ -a mutatott ($R=1,107 \pm 0,396$). A szfingomielináz (10; 30 mUN) kezelés nem gátolta a sejtek KCl-érzékenységét ($97,58 \pm 2,9\%$, $94,89 \pm 5,7\%$) (18. ábra). A raciométrikus érték 30 mUN szfingomielináz kezelés hatására sem változott. Tanulmányoztuk továbbá a szfingomielináz hatását a thapsigargin-indukált $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedésre. A thapsigargin (200 nM) képes mobilizálni a Ca^{2+} -t az intracelluláris raktárakból, ezzel növelve a sejten belüli Ca^{2+} koncentrációt. Thapsigargin hatására a kontroll tenyészeteken a sejtek $48,26\% \pm 3,9\%$ -ában detektáltunk $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedést. A szfingomielináz (10; 30 mUN) kezelés ezt az arányt nem változtatta meg szignifikáns mértékben ($44,59 \pm 4,5\%$, $43,67 \pm 3,3\%$). A kezelés raciométrikus

értékeket sem befolyásolta. Kutatócsoportunk korábban is tett ilyen megfigyelést, melyet jelen kísérletben több sejt bevonásával tovább vizsgáltunk.



18. ábra: Szfingomielináz kezelés hatása a KCl-szenzitív neuronok arányára (%). N=71-192 sejt/csoport. (kontroll vs. szfingomielináz-kezelt, egyutas ANOVA, Dunnett post hoc teszt). Az oszlopok az átlag $\pm$ SD értékeket reprezentálják. SMáz: szfingomielináz.

6.1.3 Ceramid és szfingozin kezelés hatása a TRP receptorok működésére TRG neuronokon és TRPV1 receptor-expresszáló CHO sejteken

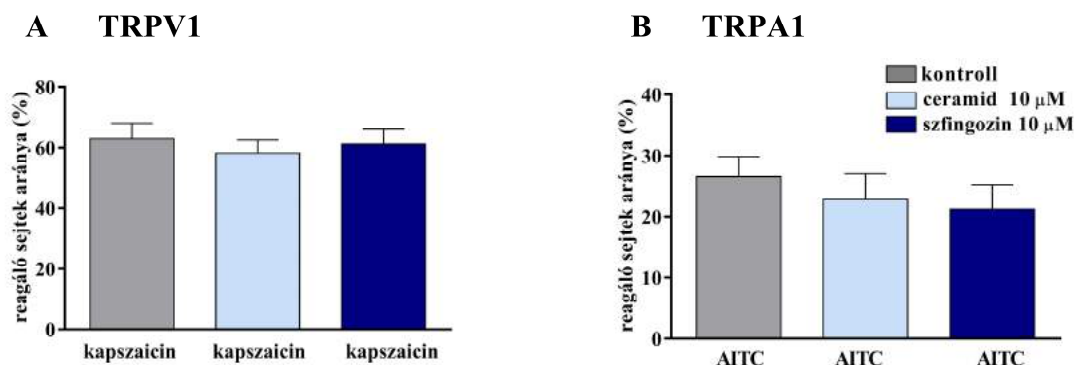
A következő kísérletsorozatban a szfingomielin szfingomielináz hatására bekövetkező hidrolízise során keletkező ceramid és származéka, a szfingozin hatását vizsgáltuk a TRPV1 és TRPA1 receptorok aktiválhatóságára primer szenzoros neuronokon. A kapszaicin-indukált válaszokat TRPV1 receptor-expresszáló CHO sejteken is tanulmányoztuk.

Az előkezelések (1; 10 μ M ceramid/szfingozin, 37 °C, 60 perc) nem gátolták a kapszaicin által kiváltott $^{45}\text{Ca}^{2+}$ akkumulációt TRPV1-expresszáló CHO sejteken, melyet $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvétel vizsgálattal bizonyítottunk.

Érzőneuronokon meghatároztuk a kapszaicin- és az AITC-szenzitív sejtek arányát kontroll, ceramid-, illetve szfingozin-kezelt (10 μ M, 60 perc, 37 °C) tenyészeteken fluoreszcens $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mérés technikával. Kontroll tenyészeteken a vizsgált neuronok $62,97 \pm 5,2\%$ -a (39/62) válaszolt kapszaicinre. Ez az érték nem csökkent szignifikáns mértékben ceramid, illetve szfingozin előkezelés hatására ($58,18 \pm 5,4\%$, 25/43 és $61,2 \pm 4,9\%$, 22/36) (19. A ábra). Az AITC-szenzitív neuronok arányát ($26,58 \pm 3,3\%$, 98/379)

sem redukálták az előkezelések (ceramid: $22,86 \pm 4,2\%$, 23/97, szfingozin: $21,23 \pm 4,05\%$, 30/145) (19. B ábra).

Meghatároztuk a hidrolízistermékek hatását a raciométrikus értékek nagyságára. A kapszaicin hatására detektált fluoreszcencia arány érték ($R=1,06 \pm 0,32$) ceramid- ($R=1,22 \pm 0,43$), illetve szfingozin-kezelést ($R=0,98 \pm 0,39$) követően nem változott szignifikáns mértékben. Az AITC kontroll körülmények között $R=0,71 \pm 0,22$ fluoreszcencia arányt eredményezett, melyre a hidrolízistermékeknek (ceramid: $R=0,62 \pm 0,23$, szfingozin: $R=0,83 \pm 0,34$) nem volt hatása.



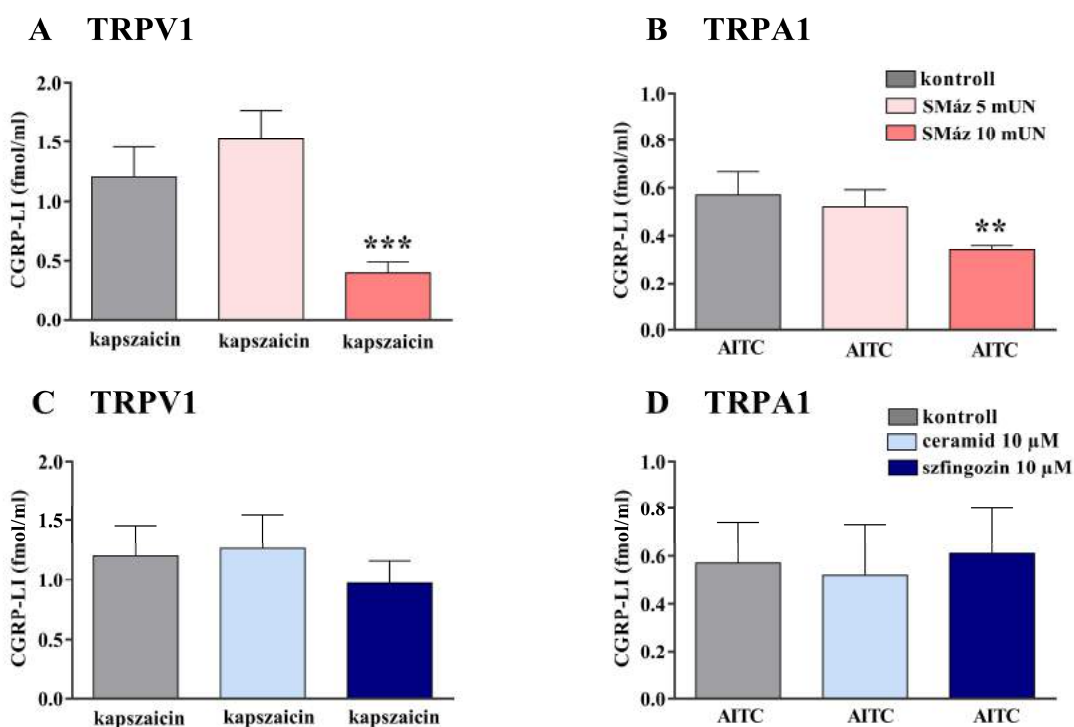
19. ábra: Ceramid és szfingozin kezelés hatása TRPV1 és TRPA1 receptorok aktiválhatóságára TRG neuronokon. (A) Kapszaicin- (B) AITC-szenzitív kontroll, ceramid- és szfingozin-kezelt (10 μ M) neuronok aránya (%), N=36-379 sejt/csoport (kontroll vs. ceramid, szfingozin-kezelt csoport, egyutas ANOVA, Dunnett post hoc teszt). Az oszlopok az átlag $\pm$ SD értékeket reprezentálják. AITC: allilizotiocianát.

6.1.4 Szfingomielináz, ceramid és szfingozin kezelés hatása a TRP receptorok működésére perifériás érzőideg-végződéseken

A perifériás érzőideg-végződéseken lokalizálódó TRP receptorok vizsgálata során a receptor aktiváció folyamán felszabadult CGRP koncentrációkat RIA módszerrel határoztuk meg. A TRPV1 receptorok kapszaicinnel (100 nM) történő aktivációja $1,2 \pm 0,25$ fmol/mg CGRP felszabadulást váltott ki izolált patkány trachea perifériás érzőideg-végződéseiből. A szfingomielináz kezelés (10 mUN) gátolta a kapszaicin-indukált CGRP exocitózist ($0,4 \pm 0,09$ fmol/mg). A kisebb koncentrációjú enzimnek (5 mUN) történő inkubációnak azonban nem volt hatása ($1,52 \pm 0,24$ fmol/mg) (20. A ábra). AITC (100 μ M) hatására $0,57 \pm 0,17$ fmol/mg CGRP felszabadulást detektáltunk, mely a kezelés hatására (5; 10 mUN) $0,52 \pm 0,07$ fmol/mg és $0,34 \pm 0,12$ fmol/mg értékekre változott (20. B ábra).

Az előkezelés nem befolyásolta az ingerlés előtti bazális CGRP felszabadulást. Ebben a kísérletsorozatban az icilin (1; 10 μ M), illetve a pregnenolon-szulfát (100 μ M) nem okozott RIA módszerrel detektálható CGRP felszabadulást a perifériás érziideg-végződésekből. A thapsigargin (200 nM) a perifériás érziideg-végződésekből nem indukált CGPR exocitózist. A kontroll körülmények között detektált CGRP koncentráció ($0,11 \pm 0,04$ fmol/mg) thapsigargin hatására nem változott szignifikáns mértékben ($0,116 \pm 0,02$ fmol/mg).

Vizsgáltuk a hidrolízistermékek hatását a perifériás érziideg-végződéseken lokalizálódó TRPV1 és TRPA1 receptorok aktiválhatóságára. A ceramid (10 μ M) nem befolyásolta a kapszaicin ($1,26 \pm 0,28$ fmol/mg) és az AITC által kiváltott ($0,52 \pm 0,21$ fmol/mg) CGRP felszabadulást. Kapszaicin, illetve AITC alkalmazásakor detektált szenzoros neuropeptid koncentráció a szfingozin kezelést követően ($0,97 \pm 0,19$ fmol/mg, $0,61 \pm 0,19$ fmol/mg) sem változott (20. C, D ábra).



20. ábra: Szfingomielináz, ceramid és szfingozin kezelés hatása a TRPV1 és TRPA1 receptorok aktiválhatóságára perifériás érziideg-végződéseken. (A) Kapszaicin és (B) AITC által kiváltott CGRP felszabadulás kontroll és szfingomielináz kezelés (10; 30 mUN) hatására. (C) Kapszaicin és (D) AITC által kiváltott CGRP felszabadulás kontroll, ceramid- és szfingozin-kezelés (10 μ M) hatására (**p<0,01,***p<0,001, kétmintás t-próba, kontroll vs. szfingomielináz-, ceramid-, szfingozin-kezelt csoport). Az oszlopok az átlag $\pm$ SD értékeket reprezentálják. SMáz: szfingomielináz, AITC:allilizotiocianát.

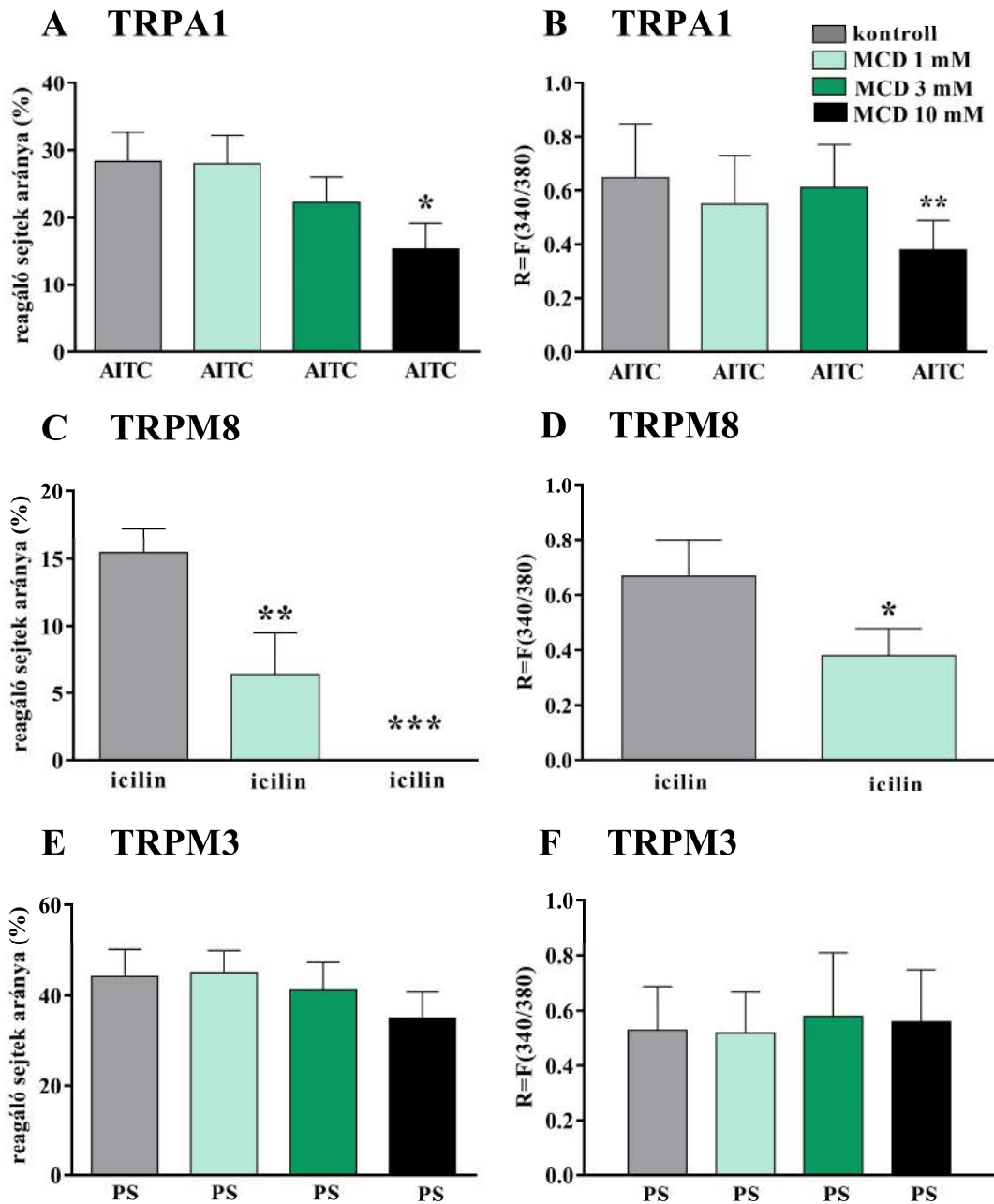
6.1.5 MCD kezelés hatása a TRP receptorok működésére TRG neuronokon

Kutatócsoportunk korábbi kísérletei bizonyították, hogy az MCD kezelés koncentrációfüggő módon csökkenti a kapszaicin által kiváltott $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést TRG neuronokban, valamint a $^{45}Ca^{2+}$ akkumulációt TRPV1-expresszáló CHO sejtekben (Szőke és mtsai., 2010). A kísérletek jelen szakaszában az MCD kezelés hatását vizsgáltuk AITC-re (200 μ M), icilinre (1 μ M), illetve pregnenolon-szulfátra (50 μ M) válaszoló érzőneuronok arányára fluoreszcens $[Ca^{2+}]_i$ mérés technikával. A sejteken MCD (1; 3; 10 mM) kezelést alkalmaztunk (45 perc, 37 °C) az agonisták alkalmazása előtt.

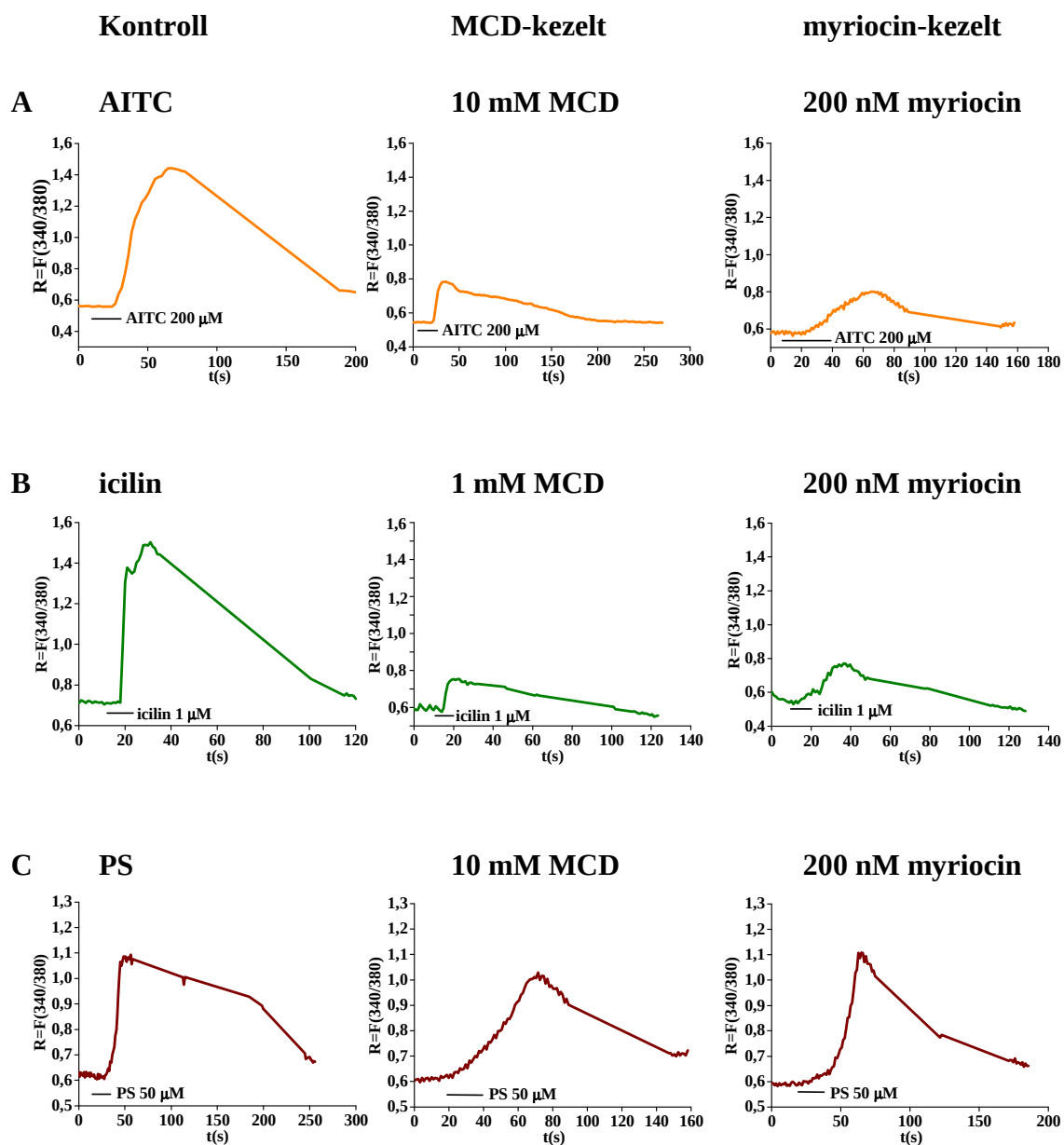
Kontroll tenyészeteken a vizsgált neuronok $28,32 \pm 4,3\%$ -a válaszolt AITC-re ($R=0,65 \pm 0,22$). A 10 mM MCD kezelés szignifikánsan csökkentette az AITC-szenzitív neuronok arányát ($15,3 \pm 3,9\%$), a raciométrikus érték $0,38 \pm 0,11$ -re csökkent (21. A ábra). Ezzel szemben az 1 és 3 mM MCD kezelés nem befolyásolta a raciométrikus érték nagyságát ($R=0,55 \pm 0,18$, illetve $R=0,61 \pm 0,16$) (21. B ábra).

Az icilinre reagáló kontroll sejtek aránya $15,43 \pm 1,8\%$ volt, mely érték $6,41 \pm 3,1\%$ -ra csökkent 1 mM MCD-vel történő inkubációt követően. A 3 mM MCD kezelés eltörölte a válaszokat (21. C ábra). Az 1 mM MCD szignifikánsan csökkentette a raciométrikus érték nagyságát, mely kontroll esetben $0,67 \pm 0,13$ volt, a kezelés hatására $R=0,38 \pm 0,1$ értékre csökkent (21. D ábra).

Pregnenolon-szulfátra a kontroll neuronok $44,28 \pm 5,8\%$ -a válaszolt. Az előkezelésnek nem volt hatása a TRPM3 receptor aktiválhatóságára, $45,11 \pm 4,7\%$, $41,29 \pm 5,9\%$ és $34,99 \pm 5,9\%$ pregnenolon-szulfát-szenzitív neuront detektáltunk 1; 3; illetve 10 mM MCD kezelést követően (21. E ábra). A kezelés nem befolyásolta a raciométrikus értékeket, kontroll körülmények között $R=0,53 \pm 0,16$, míg 1; 3 és 10 mM MCD hatására $0,52 \pm 0,15$; $0,58 \pm 0,23$ és $0,56 \pm 0,19$ értékeket mértünk (21. F ábra). Eredeti regisztrátumok szemléltetik a kezelés hatását a fluoreszcencia arány értékekre (22. ábra).



21. ábra: MCD kezelés hatása TRPA1, TRPM3 és TRPM8 receptorok aktiválhatóságára TRG neuronokon. (A) AITC-szenzitív kontroll és MCD-kezelt (1; 3; 10 mM) neuronok aránya (%), N=86-104 sejt/csoport. (C) Icilin-szenzitív kontroll és MCD-kezelt (1; 3 mM) neuronok aránya (%), N=37-109 sejt/csoport, (E) pregnenolon-szulfát-érzékeny kontroll és MCD-kezelt (1; 3; 10 mM) neuronok aránya (%), N=42-64 sejt/csoport. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, kontroll vs. MCD-kezelt, egyutas ANOVA, Dunnett post hoc teszt). (A, C, E) Az oszlopok az átlag $\pm$ SD értékeket reprezentálják. (B) AITC, (D) icilin és (F) pregnenolon-szulfát hatására kontroll és MCD-kezelt (1; 3; 10 mM) neuronokban detektált racimetrikus értékek. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, kontroll vs. MCD-kezelt, kétmintás t-próba). (B, D, F) Az oszlopok az átlag $\pm$ SD értékeket reprezentálják. MCD: metil- β -ciklodextrin, AITC: allilizotiocianát, PS: pregnenolon-szulfát.

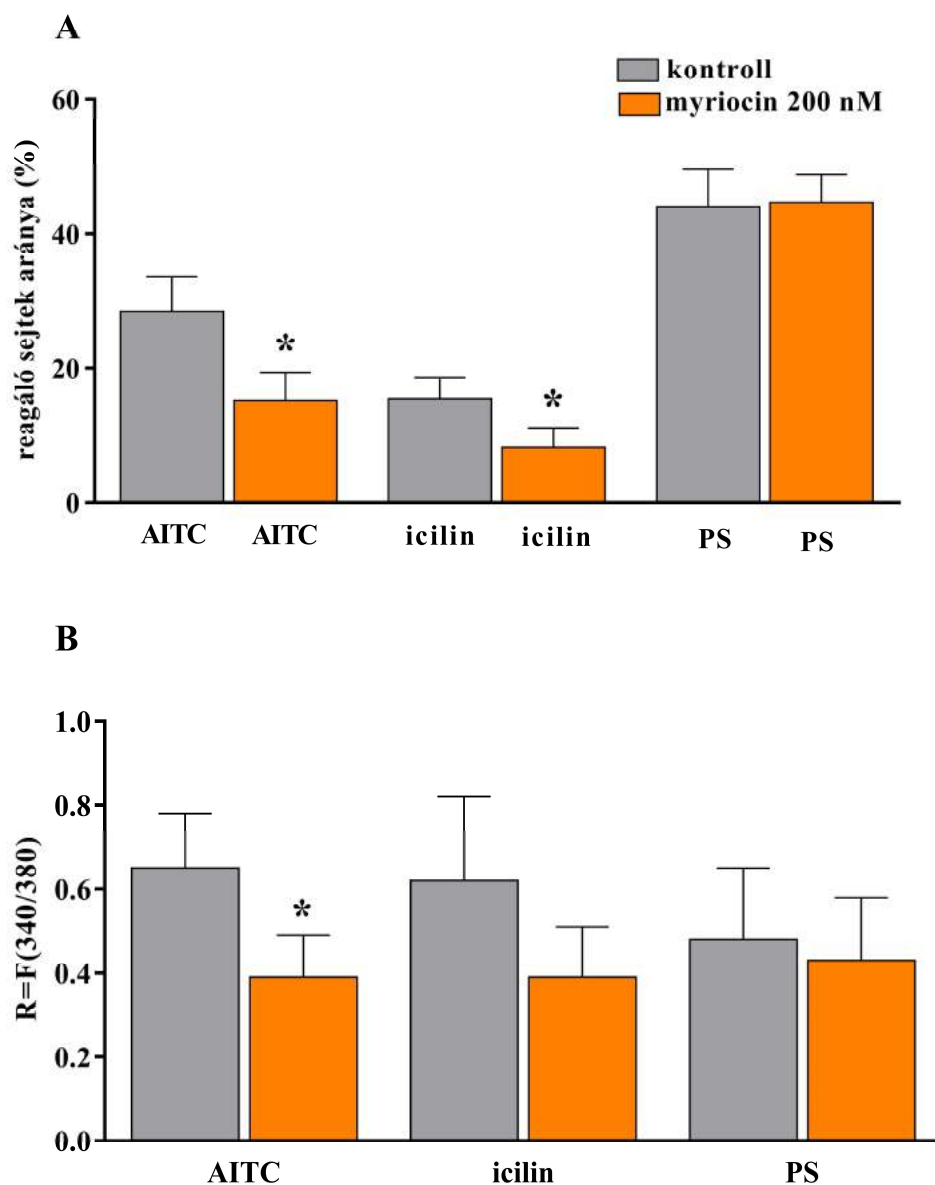


22. ábra: MCD és myriocin kezelés hatása TRPA1, TRPM8 és TRPM3 receptorok aktiválhatóságára TRG neuronokon. Az $R=F(340/380)$ érték változása fura-2AM-mel feltöltött neuronokban. Eredeti regisztrátumok (A) AITC-, (B) icilin-és (C) pregnenolon-szulfát-szenzitív kontroll, MCD- (1; 10 mM) és myriocin (200 nM) -kezelt neuronokon. MCD: metil- β -ciklodextrin, AITC: allilizotiocianát, PS: pregnenolon-szulfát.

6.1.6 Myriocin kezelés hatása a TRP receptorok működésére TRG neuronokon

Ebben a kísérletsorozatban a szfingolipid bioszintézis inhibitor myriocin (200 nM) előkezelést alkalmaztunk (37 °C, egy éjszakán át). A kezelés hatását fluoreszcens $[Ca^{2+}]_i$ mérés technikával határoztuk meg érzőneuronokon. Kontroll tenyészeteken a vizsgált neuronok $28,32 \pm 5,2\%$ -a válaszolt AITC-re és $15,43 \pm 1,8\%$ -a mutatott icilin-szenzitivitást. A myriocin kezelés szignifikánsan csökkentette az AITC-, illetve az icilin-szenzitív neuronok arányát ($15,12 \pm 4,2\%$, $8,19 \pm 2,9\%$). A pregnenolon-szulfátra reagáló kontroll sejtek aránya $44 \pm 5,6\%$ volt, mely értéket a myriocin kezelés nem csökkentette szignifikáns mértékben, a neuronok $44,66 \pm 6,2\%$ -a a kezelést követően érzékeny volt pregnenolon-szulfátra (23. A ábra).

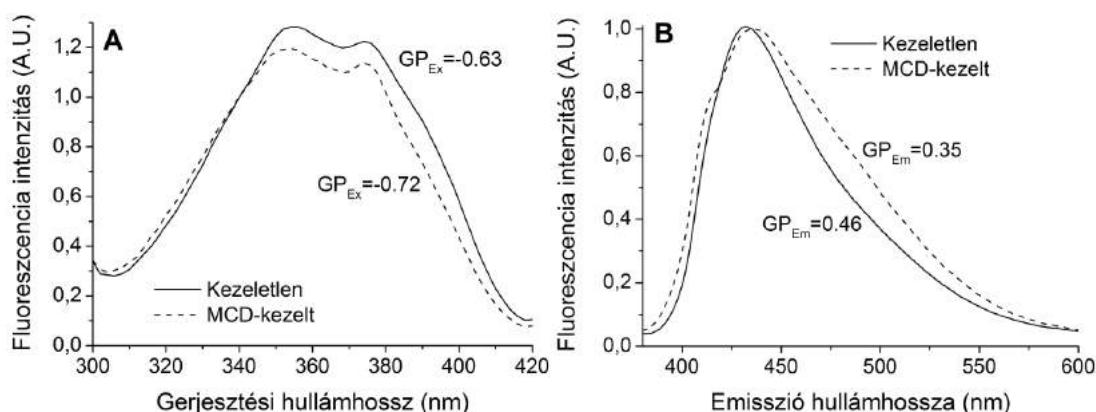
Kontroll tenyészeteken az AITC, icilin, és pregnenolon-szulfát alkalmazásakor detektált raciométrikus értékek a következők voltak: $R=0,65 \pm 0,13$, $R=0,62 \pm 0,21$, $R=0,48 \pm 0,17$. A kezelés szignifikánsan csökkentette az AITC által okozott fluoreszcencia arány emelkedést ($R=0,39 \pm 0,1$) és redukálta az icilin alkalmazásakor detektált R értéket ($0,39 \pm 0,12$), melynek mértéke azonban nem volt szignifikáns. A myriocinnek nem volt hatása a pregnenolon-szulfát-indukált R érték emelkedésre ($R=0,43 \pm 0,15$) (23. B ábra). Eredeti regisztrátumok szemléltetik a kezelés hatását a fluoreszcencia arány értékekre (22. ábra).



23. ábra: Myriocin kezelés hatása TRPA1, TRPM8 és TRPM3 receptorok aktiválhatóságára TRG neuronokon. (A) AITC-, icilin- és pregnenolon-szulfát-szenzitív kontroll és myriocin-kezelt (200 nM) neuronok aránya (%). N=86-104 sejt/csoport. (* $p < 0,05$, kontroll vs. myriocin-kezelt csoport, egyutas ANOVA, Dunnett post hoc teszt). Az oszlopok az átlag $\pm$ SD értékeket reprezentálják. (B) AITC, icilin és pregnenolon-szulfát hatására kontroll és myriocin-kezelt (200 nM) neuronokban detektált racimétrikus értékek. (* $p < 0,05$, kontroll vs. myriocin-kezelt csoport, kétmintás t-próba). Az oszlopok az átlag $\pm$ SD értékeket reprezentálják. AITC: allilizotiocianát, PS: pregnenolon-szulfát.

6.1.7 MCD kezelés hatása a plazmamembrán rendezett és rendezetlen fázisainak arányára

A laurdan emissziós spektrumának vizsgálata a plazmamembrán fluiditásának és rendezettségének meghatározására alkalmas módszer (Harris és mtsai., 2002). Jól használható a rendezett és rendezetlen (MCD-kezelt) membrán fázisok közti átmenet jellemzésére (Golfetto és mtsai., 2013). A laurdan emissziós és abszorpciós spektrumának pozícióját és formáját a dipólus relaxáció sebessége és a mikrokörnyezet polaritása befolyásolja. A rendezett fázisban az emissziós maximum 435 nm-en detektálható, míg a rendezetlen fázisban a maximum érték 490 nm-en alakul ki. Ez a vörös-eltolódás a nagyobb mértékű polarizáció és a dipólus relaxáció következménye. A gerjesztési spektrumban ez a hatás kék-eltolódást okoz. A spektrális változások számszerűsítésére általános polarizáció (GP) értékeket határoztunk meg, mind az emissziós mind a gerjesztési spektrumok esetében. Az emissziós spektrumból meghatározott GP_{Em} érték kontroll esetben 0,46 volt, mely az MCD kezelés hatására 0,35-re csökkent. A gerjesztési spektrum alapján számolt GP_{Ex} érték -0,63-ról, -0,72-re csökkent MCD kezelés hatására (24. ábra). A GP értékek ilyen irányú változásai a plazmamembrán rendezettségének csökkenésére és a vízmolekulák fokozott jelenlétére utalnak. MCD-vel való inkubáció hatására olyan membrán domének depletálódnak, melyekben a molekulák hidratáltsági szintje alacsony. Ez a tulajdonság a rendezett folyékony doménekre („liquid ordered domain”) jellemző, amelyek a lipid raftok megfelelői. Ezen spektrális változások egyértelmű bizonyítékot szolgáltatnak arra nézve, hogy a MCD kezelés (10 mM) a lipid tutajok diszrupcióját okozza.



24. ábra: MCD kezelés hatása a laurdan gerjesztési és emissziós spektrumára. (A) 340 nm-re normalizált gerjesztési spektrum, $\lambda_{Em}=360$ nm. (B) 435 nm-re normalizált emissziós spektrum, $\lambda_{Ex}=360$ nm.

6.1.8 MCD kezelés koleszterin depletáló hatásának kimutatása

Az MCD kezelés (10 mM) erőteljesen csökkentette a plazmamembrán filipin jelölődését TRG neuronokon és TRPV1 receptor-expresszálo CHO sejteken. Kontroll sejtekben a koleszterin a plazmamembránban és a perinukleáris kompartmentekben is megtalálható. MCD-kezelt TRPV1 receptor-expresszálo CHO sejtekben és TRG neuronokban a koleszterin-jelölés eltörlődött (25. ábra).

25. ábra: Filipin fluoreszcens jelölés. (A) Kontroll és (B) MCD-kezelt TRPV1 receptor-expresszálo CHO sejtek fluoreszcens képe. (C, D) Kontroll és (E, F) MCD-kezelt TRG neuronok (C, E) fénymikroszkópos és (D, F) fluoreszcens képe (lépték: 50 μm).

6.1.9 Összefoglalás

A különböző kezelésekkel kapott, az előzőekben már ismertetett eredményeket az alábbi táblázat tartalmazza, kiegészítve kutatócsoportunk korábbi eredményeivel (Szőke és mtsai., 2010) (2. táblázat).

Receptor	TRPV1	TRPA1	TRPM8	TRPM3
Agonista	kapszaicin	AITC	icilin	PS
MCD kezelés	↓ 3 mM	↓ 10 mM	↓ 1 mM	n.s.
SMáz kezelés	↓ 30 mUN	↓ 10 mUN	↓ 30 mUN	n.s.
Myriocin kezelés	↓ 50 nM	↓ 200 nM	↓ 200 nM	n.s.

2. táblázat: MCD, szfingomielináz és myriocin kezelés hatásának összefoglalása a TRP receptorok aktiválhatóságára TRG neuronokon. ↓: szignifikánsan csökkent receptor aktiválhatóság és az azt kiváltó legalacsonyabb koncentrációjú kezelés, n.s.: nincs szignifikáns különbség a kontroll értékhez képest. AITC: allilizotiocianát, PS: pregnenolon-szulfát.

6.2 A hidrogén-szulfid donor vegyületek és a DMTS target molekulájának azonosítása

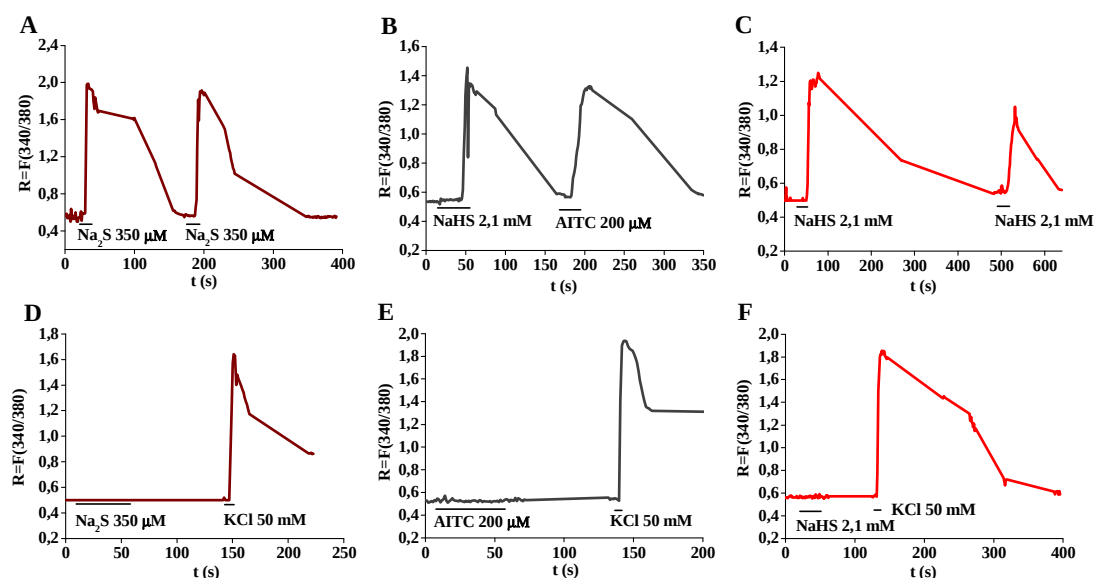
6.2.1 A hidrogén-szulfid donor vegyületek (Na₂S, NaHS) target molekulájának azonosítása TRG neuronokon

A kísérletek első szakaszában meghatároztuk az Na₂S- és az NaHS-szenzitív érzőneuronok arányát fluoreszcens [Ca²⁺]_i mérés technikával. Mivel a H₂S illékony gáz a bemérést követően a H₂S donorok pontos koncentrációját a mérések alatt amperometriás H₂S szenzorral határoztuk meg (Nagy és mtsai., 2014). A fluoreszcens [Ca²⁺]_i mérések időpontjában mért pontos koncentrációk: NaHS (230 μM és 2,1 mM), Na₂S (140 μM és 350 μM). A gáztranszmitter hatására nagymértékű [Ca²⁺]_i emelkedést detektáltunk TRPA1^{+/+} egér TRG neuronokon, mely 20-30 s latencia után fejlődött ki. A válaszok kinetikai jellemzői ioncsatorna aktivációra utaltak. Az NaHS-érzékeny neurónok aránya 15,38% (4/26), illetve 21,57% (33/153) volt 230 μM, illetve 2,1 mM koncentrációk alkalmazásakor. A vizsgált neurónok 8,69%-a (2/23), illetve 11,86%-a

(7/59) válaszolt Na_2S -re (140 és 350 μM) (3. táblázat). A detektált $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedés reprodukálható volt, illetve az NaHS-szenzitív sejtek a szelektív TRPA1 agonista AITC-re is érzékenyek voltak (26. A, B, C ábra). Az AITC-szenzitív érzőneuronok relatív mennyisége 26,27% (31/118) volt, a válaszok kinetikai jellemzői a H_2S donor szignálokhoz hasonlóan alakultak. A kísérletek második szakaszában TRPA1^{-/-} egér TRG sejttenyészetben is elvégeztük a méréseket. A TRPA1 receptor hiánya esetén AITC, NaHS és Na_2S hatására sem detektáltunk $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedést. KCl (50 mM) adásával ellenőriztük a kísérlet végén a sejtek életképességét (26. D, E, F ábra).

	AITC	NaHS		Na ₂ S	
Koncentráció	200 μM	230 μM	2,1 mM	140 μM	350 μM
Sejtek száma	118	26	153	23	59
Reagáló sejtek száma	31	4	33	2	7
Reagáló sejtek aránya (%)	26,27	15,38	21,57	8,69	11,86
Minden adat n=3-5 független kísérlet eredményéből származik.					

3. táblázat. AITC- , NaHS- és Na_2S -szenzitív TRPA1^{+/+} egér TRG neuronok abszolút és relatív mennyisége. AITC: allilizotiocianát.



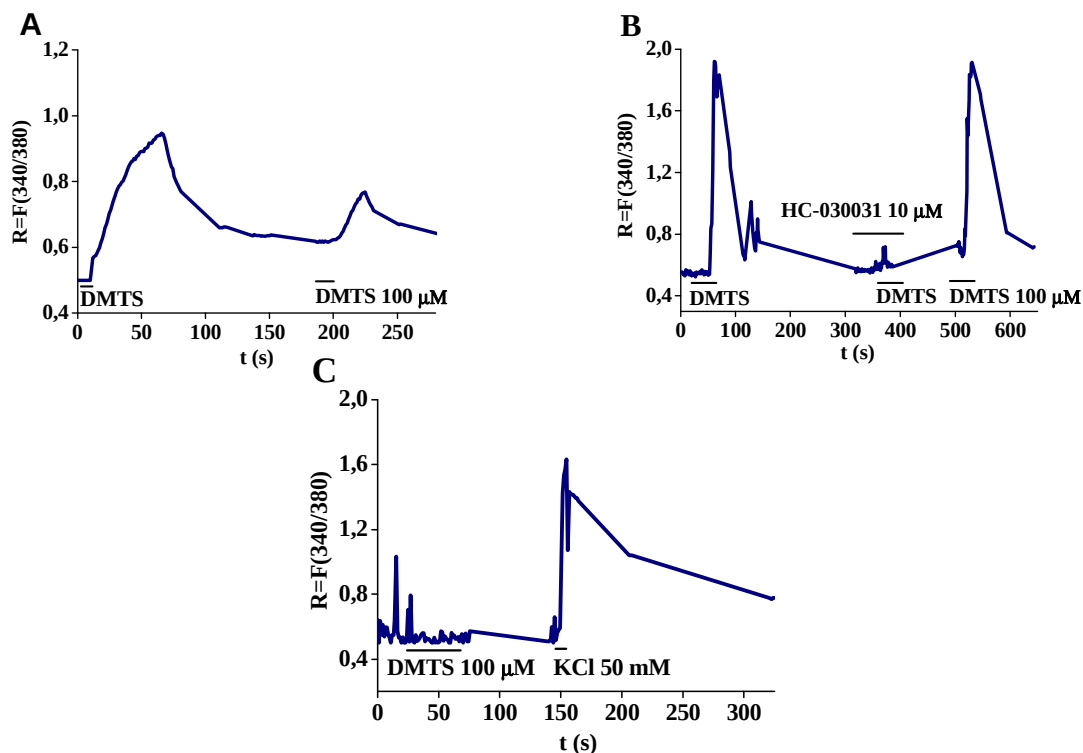
26. ábra: AITC, NaHS és Na₂S hatása TRG neuronokon. Az R=F(340/380) érték változása fura-2 AM-mel feltöltött neuronokban. Eredeti regisztrátumok (A) Na₂S, (B) AITC és (C) NaHS hatásáról TRPA1^{+/+} egér TRG neuronokon. Eredeti regisztrátumok (D) Na₂S, (E) AITC és (F) NaHS hatásáról TRPA1^{-/-} egér TRG neuronokon. AITC: allilizotiocianát.

6.2.2 A DMTS target molekulájának azonosítása TRG neuronokon

A kísérletek első szakaszában meghatároztuk a DMTS-szenzitív érzőneuronok arányát fluoreszcens $[Ca^{2+}]_i$ méréssel. A DMTS (100 μ M) a sejtek 11,81%-ában (13/110) váltott ki gyorsan kifejlődő, ismételhető Ca^{2+} választ. Az AITC (200 μ M)-érzékeny sejtek aránya 18,00% (9/50) volt. A dialkil-poliszulfid vegyület alkalmazásakor kifejlődő Ca^{2+} szignál kinetikai jellemzői a TRPA1 szelektív agonista AITC válaszhoz hasonlóak voltak (27. A ábra).

A DMTS célmolekulájának meghatározása érdekében TRPA1^{-/-} egér TRG tenyészetben is teszteltük a poliszulfid hatását. TRPA1 génhíányos egér érzőneuronokon a DMTS és az AITC sem váltott ki hatást. KCl (50 mM) adásával ellenőriztük a kísérlet végén a sejtek életképességét (27. C ábra).

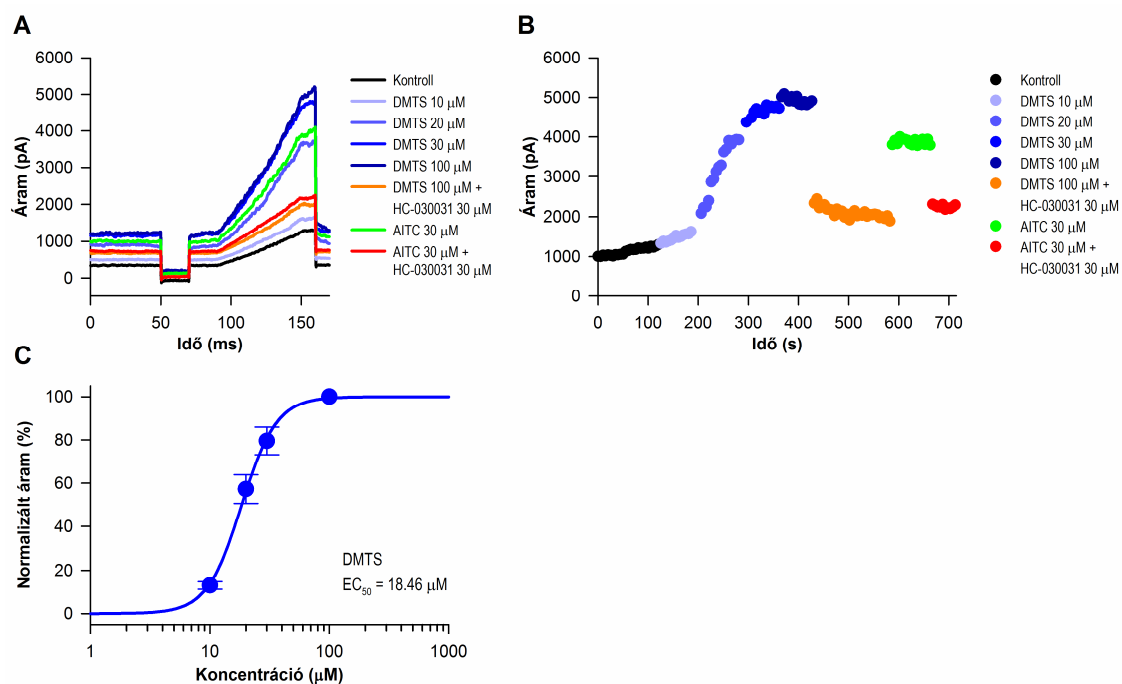
A DMTS TRPA1 agonista hatásának megerősítése érdekében egy további vizsgálatot végeztünk. A TRPA1 szelektív antagonistá vegyület a HC-030031 (10 μ M) gátló hatását teszteltük a DMTS és az AITC válaszokra. A HC-030031 szignifikánsan csökkentette az AITC-érzékeny neuronok arányát, mely érték 2,7%-ra (1/36) csökkent. A TRPA1 szelektív antagonistá eltörölte a DMTS-indukált $[Ca^{2+}]_i$ növekedést, nem detektáltunk reagáló sejtet (27. B ábra).



27. ábra: DMTS hatása TRG neuronokon. Az $R = F(340/380)$ érték változása fura-2 AM-mel feltöltött neuronokban. Eredeti regisztrátumok a DMTS hatásáról (A) $TRPA1^{+/+}$ és (C) $TRPA1^{-/-}$ egér TRG neuronokon. (B) Eredeti regisztrátum a $TRPA1$ szelektív antagonistája (HC-030031) gátló hatásáról $TRPA1^{+/+}$ egér TRG neuronokon. DMTS: dimetil-triszulfid.

6.2.3 A DMTS hatása a $TRPA1$ áramokra $TRPA1$ receptor-expresszáló CHO sejteken

Automata patch-clamp módszerrel $TRPA1$ receptor-expresszáló CHO sejteken különböző koncentrációjú (10; 20; 30; 100 μM) DMTS oldatokat teszteltünk, pozitív kontrollként 30 μM AITC-t alkalmaztunk. A DMTS 100 μM koncentrációban nagymértékű $TRPA1$ áramot váltott ki, mely azonban a tesztanyag koncentrációjának növelésével (500 μM) tovább nem emelkedett. A HC-030031 (30 μM) gátolta a DMTS (100 μM) által indukált $TRPA1$ áramot (28. A ábra). A $TRPA1$ áram amplitúdójában a tesztanyagok hatására bekövetkezett változások időbeli kialakulását a 28. B ábra szemlélteti. Dózis-hatás görbét vettünk fel 10; 20; 30 és 100 μM DMTS alkalmazásával, melyen jól látszik a tesztanyag dóziszfüggő hatása (28. C ábra). Az áramokat 100 μM DMTS hatására detektált áram amplitúdójához normalizáltuk. Az adatokat Hill egyenlettel illesztve az EC_{50} értéket $18,46 \pm 0,31 \mu M$ -nak határoztuk meg.



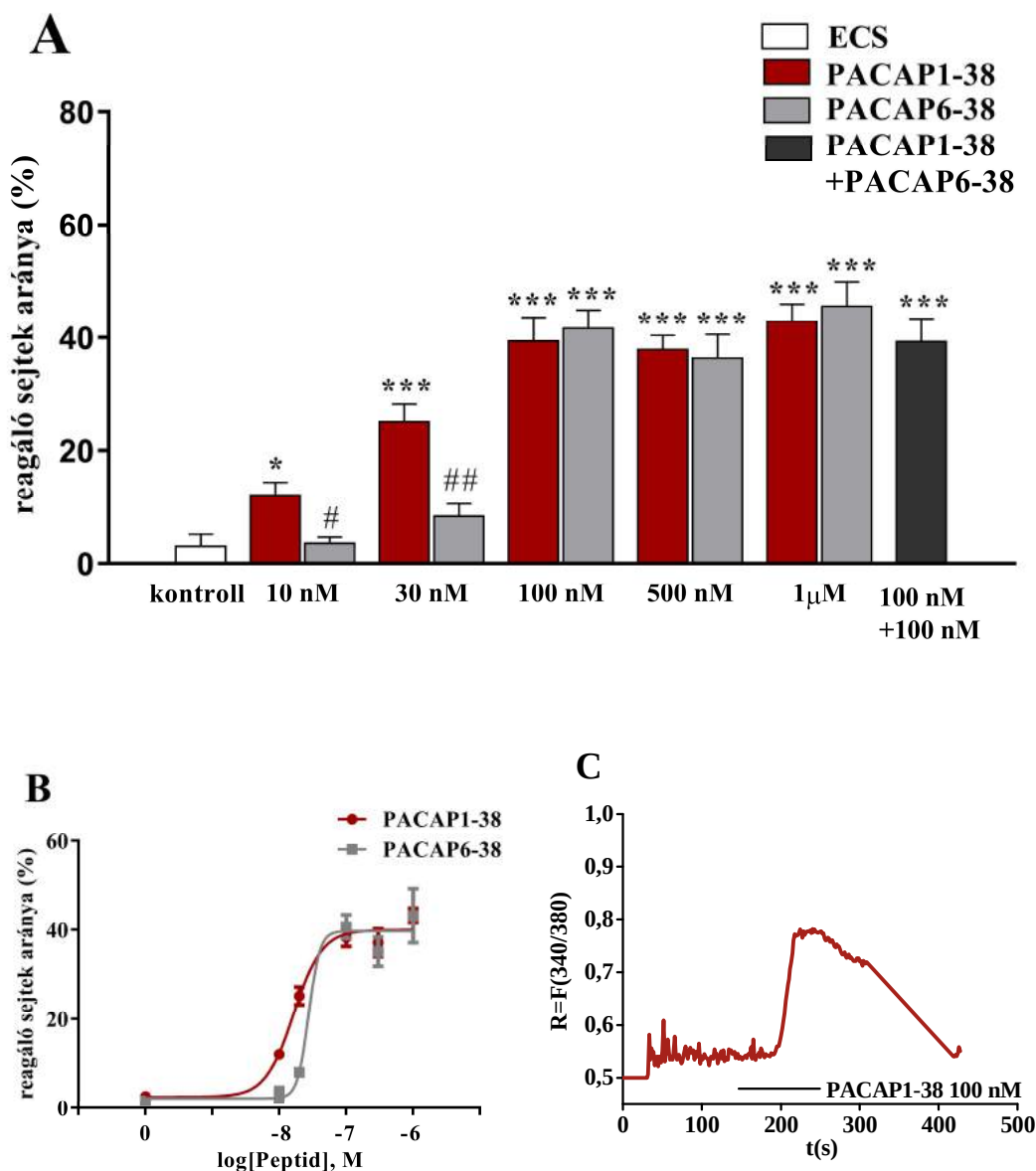
28. ábra: A DMTS TRPA1 receptoron kifejtett koncentrációfüggő hatása. (A) Eredeti regisztrátumok szemléltetik a 10; 20; 30 és 100 μM DMTS TRPA1 áramra gyakorolt hatását. (B) A TRPA1 áram amplitúdójában a tesztanyagok hatására bekövetkezett változások időbeli kialakulása. A kifelé irányuló áramokat a feszültségprotokoll 50 mV-os szakaszán határoztuk meg. (C) Koncentráció-hatás görbe reprezentálja a DMTS hatását a TRPA1 receptoron. A mérési pontok öt DMTS-sel kezelt CHO-TRPA1 sejt átlag $\pm$ SEM értékeit reprezentálják. DMTS: dimetil-triszulfid, AITC: allilizotiocianát.

6.3 A PACAP receptor agonisták és antagonisták hatásának vizsgálata

6.3.1 A PACAP receptor agonisták és antagonisták hatása TRG neuronokon

Wistar patkány TRG neuronokon

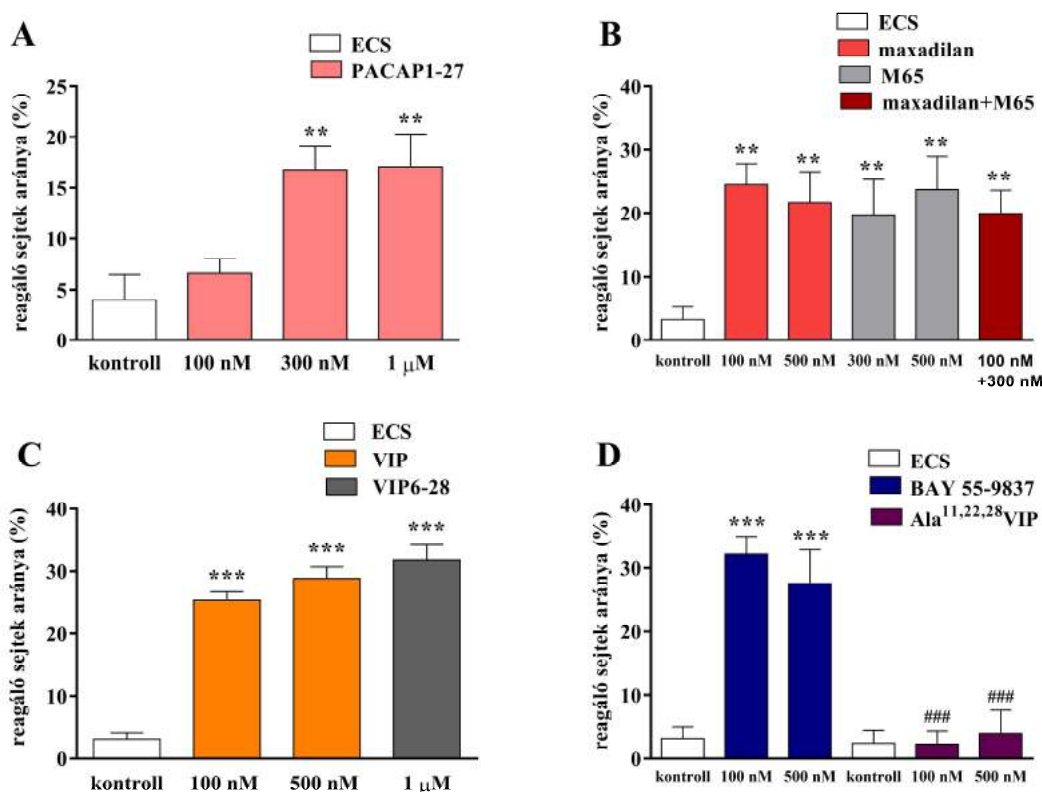
A kísérletek első szakaszában teszteltük a PACAP1-38 hatását különböző koncentrációkban (10; 30; 100; 500 nM és 1 μ M) TRG sejteken fluoreszcens $[Ca^{2+}]_i$ méréstechnikával. Kontrollként ECS-t alkalmaztunk 240 s-ig, a sejtek $3,25 \pm 0,58\%$ -nál spontán Ca^{2+} szignál fejlődött ki. Lassan növekvő $[Ca^{2+}]_i$ -t detektáltunk PACAP1-38 alkalmazásakor, mely kinetika a G-protein-kapcsolt receptor aktivációra jellemző. A PACAP1-38-szenzitív (10; 30; 100; 500 nM és 1 μ M) neuronok aránya $12,05 \pm 1,67\%$ (14/115), $25,24 \pm 3,46\%$ (20/80), $38,29 \pm 3,5\%$ (39/99), $37,14 \pm 5,4\%$ (28/74), illetve $43,29 \pm 2,89\%$ (30/70) volt. Ezt követően a PAC1/VPAC2 receptor antagonistával, PACAP6-38-al kíséreltük meg a válaszok kialakulását gátolni. Elsőként az antagonistát önmagában alkalmaztuk (10; 30; 100; 500 nM és 1 μ M), mely nem várt módon $[Ca^{2+}]_i$ növekedést okozott a vizsgált neuronok jelentős részében ($3 \pm 2,9\%$ (3/83), $8,06 \pm 1,65\%$ (9/107), $40,76 \pm 4,67\%$ (40/96), $35,1 \pm 5,69\%$ (36/99) és $43,2 \pm 10,62\%$ (31/68)). Az antagonista (100 nM) jelenlétében nem csökkent az agonistára (100 nM) reagáló a neuronpopuláció aránya ($37,56 \pm 6,87\%$, 22/56) (29. A ábra). A koncentráció-hatás görbék alapján meghatároztuk az EC_{50} értékeket: 44,9 nM (PACAP1-38), 74,9 nM (PACAP6-38) (29. B ábra). Eredeti regisztrátum szemlélteti a PACAP1-38 hatását TRG neuronokon (29. C ábra).



29. ábra: PACAP1-38 és PACAP6-38 hatása patkány TRG neuronokon. (A) PACAP1-38, PACAP6-38-szenzitív neuronok aránya (%), N=56-115 sejt/csoport. (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, ECS vs. PACAP1-38, PACAP6-38, egyutas ANOVA, Bonferroni post hoc teszt. (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$, PACAP1-38 vs. PACAP6-38, egyutas ANOVA, Bonferroni post hoc teszt). Az oszlopok az átlag $\pm$ SEM értékeket reprezentálják. (B) Koncentráció-hatás görbe szemlélteti a PACAP1-38 és PACAP6-38 hatását érzőneuronokon. A mérési pontok az átlag $\pm$ SEM értékeket reprezentálják. (C) Az $R=F(340/380)$ érték változása fura-2-AM-mel feltöltött neuronokban. Eredeti regisztrátum a PACAP1-38 hatásáról érzőneuronokon.

A PACAP1-27-et három koncentrációban teszteltük (100; 300 nM; 1 μ M), melyre a neuronok $6,61 \pm 1,42\%$ -a (4/61), $16,8 \pm 2,69\%$ -a (10/60), illetve $17,09 \pm 3,22\%$ -a (8/49) reagált (30. A ábra). A szelektív PAC1 agonista maxadilan-szenzitív (100; 500 nM) sejtek relatív mennyisége $24,52 \pm 3,33\%$ (25/100), illetve $21,66 \pm 4,93\%$ (16/70) volt. A vizsgált sejtek $19,72 \pm 5,66\%$ -a (13/65), illetve $23,71 \pm 5,27\%$ -a (14/60) a PAC1 antagonist M65-

re (300; 500 nM) is válaszolt. A maxadilan (100 nM) és M65 (300 nM) kombinációra a sejtek $19,9 \pm 3,71\%$ -a (16/82) reagált (30. B ábra). Meghatároztuk a neuronok arányát, melyekben megemelkedett a $[Ca^{2+}]_i$ 100; illetve 500 nM VIP hatására ($24,56 \pm 2,94\%$, 32/126; illetve $28,09 \pm 4\%$, 28/82). A vizsgált neuronok $32,11 \pm 3,65\%$ -a (20/63) válaszolt VIP6-28-ra (1 μ M) (30. C ábra). A VPAC2 agonista BAY 55-9837-szenzitív (100; 500 nM) sejtek aránya $32,1 \pm 2,81\%$ (27/83), illetve $27,54 \pm 5,27\%$ (14/50) volt. Ezzel ellentétben a VPAC1 receptor szelektív Ala^{11,22,28}VIP-nek (100; 500 nM) nem volt számottevő hatása a $[Ca^{2+}]_i$ -re ($2,34 \pm 2,04\%$, 2/80; $3,96 \pm 3,63\%$, 3/70) (30. D ábra).

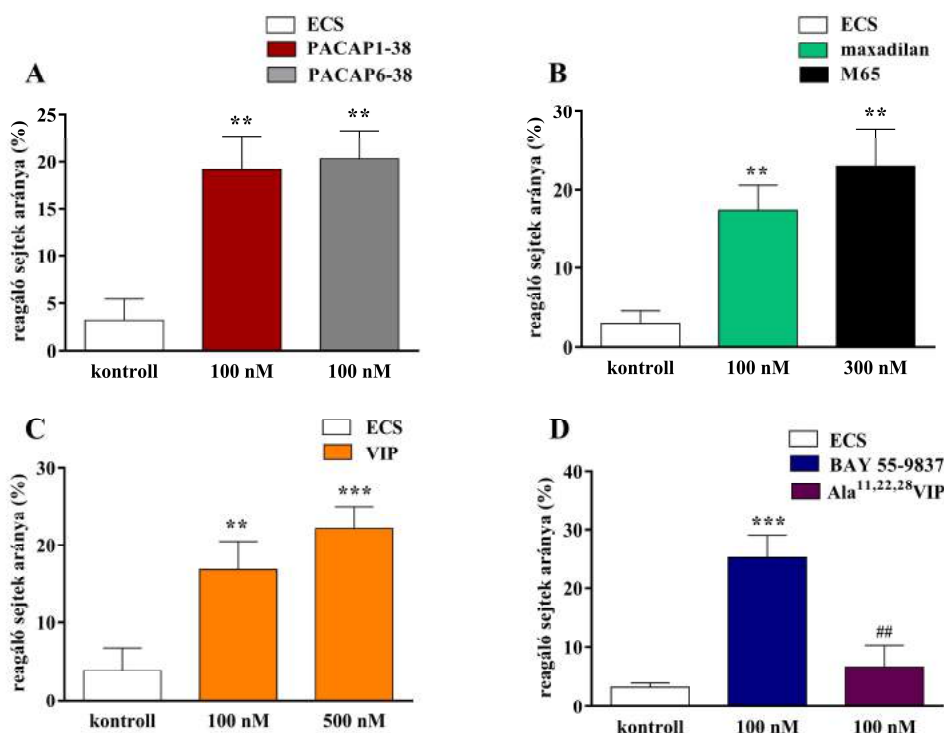


30. ábra: PACAP1-27, maxadilan, M65, VIP, VIP6-28, Ala^{11,22,28}VIP és BAY 55-9837 hatása patkány TRG neuronokon. (A) PACAP1-27-, (B) maxadilan-, M65-, (C) VIP-, VIP6-28- (D) Ala^{11,22,28}VIP-, BAY 55-9837-szenzitív neuronok aránya (%), N=49-126 sejt/csoport. (**p<0,01; ***p<0,001, ECS vs. PACAP1-27, maxadilan, M65, VIP, VIP6-28, Ala^{11,22,28}VIP, BAY 55-9837, egyutas ANOVA, Bonferroni post hoc teszt. ###p<0,001, Ala^{11,22,28}VIP vs. BAY 55-9837, egyutas ANOVA, Bonferroni post hoc teszt). Az oszlopok az átlag $\pm$ SEM értékeket reprezentálják.

A $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés hátterében álló mechanizmus felderítése érdekében Ca^{2+} mentes ECS alkalmazásával is elvégeztük a kísérleteket. PACAP1-27-re, PACAP1-38-ra, illetve PACAP6-38-ra (100 nM) reagáló neuronok aránya Ca^{2+} mentes közegben az alábbiak szerint alakult: 17,94% (7/39), 32,55% (42/129), 33,33% (52/156).

CD1 egér TRG neuronokon

CD1 egér TRG neuronokon a patkány TRG sejteken maximális választ eredményező koncentrációban alkalmaztuk a peptideket. A vizsgált neuronok $19,11 \pm 3,58\%$ -a (29/150) válaszolt PACAP1-38-ra (100 nM). A patkány TRG neuronokon tapasztalt jelenséget figyeltük meg PACAP6-38 (100 nM) alkalmazásakor, fluoreszcencia arány növekedést detektáltunk a neuronok $20,3 \pm 2,98\%$ -ában (14/70) (31. A ábra). Mind a szelektív PAC1 receptor agonista maxadilan (100 nM), mind az antagonistá M65 (300 nM) a patkány TRG neuronokon detektált értékekhez hasonló válaszokat váltott ki egér TRG sejteken ($17,35 \pm 3,2\%$, 10/62, $22,98 \pm 4,72\%$, 10/45) (31. B ábra). A VIP-szenzitív (100; 500 nM) neuronok aránya $16,89 \pm 3,63\%$ (8/46), illetve $22,12 \pm 2,81\%$ (9/42) volt (31. C ábra). A szelektív VPAC2 agonista BAY 55-9837 (100 nM) által kiváltott $[Ca^{2+}]_i$ növekedést a sejtek $25,3 \pm 3,78\%$ -ában (16/64) regisztráltunk, míg a VPAC1 szelektív Ala^{11,22,28}VIP-re (100 nM) a neuronok mindössze $6,63 \pm 3,64\%$ -a (2/29) reagált (31. D ábra).



31. ábra: PACAP1-38, PACAP6-38, maxadilan, M65, VIP, Ala^{11,22,28}VIP és BAY 55-9837 hatása egér TRG neuronokon. (A) PACAP1-38-, PACAP6-38-, (B) maxadilan-, M65-, (C) VIP-, (D) Ala^{11,22,28}VIP-, BAY 55-9837-szenzitív neuronok aránya (%), N=29-150 sejt/csoport. (**p<0,01; ***p<0,001, ECS vs. PACAP1-38, PACAP6-38, maxadilan, M65, VIP, Ala^{11,22,28}VIP, BAY 55-9837, egyutas ANOVA, Bonferroni post hoc teszt. ##p<0,01, Ala^{11,22,28}VIP vs. BAY 55-9837, egyutas ANOVA, Bonferroni post hoc teszt). Az oszlopok az átlag $\pm$ SEM értékeket reprezentálják.

6.3.2 A PACAP receptor agonisták és antagonisták hatása PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptor-expresszáló sejtvonalakon

PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptor-expresszáló CHO sejteken három különböző módszert alkalmaztunk: fluoreszcens $[Ca^{2+}]_i$ mérést, $^{45}Ca^{2+}$ felvétel vizsgálatokat és $[^{35}S]GTP\gamma S$ kötődési tesztet. A fluoreszcens $[Ca^{2+}]_i$ mérés során a PACAP1-38, a PACAP6-38, a maxadilán, az Ala^{11,22,28}VIP és a BAY 55-9837 alkalmazott koncentrációja 100 nM volt, míg az M65-öt 300 nM koncentrációban teszteltük (N=130-280). Emelkedő koncentrációban detektáltuk a PACAP1-38, PACAP6-38, VIP, VIP6-28, maxadilán, M65, Ala^{11,22,28}VIP, BAY 55-9837 (0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 nM; 1 μ M) hatását $[^{35}S]GTP\gamma S$ kötődési tesztben.

PAC1 receptor-expresszáló sejtvonal

A vizsgált CHO sejtek $89 \pm 11,1\%$ -a válaszolt PACAP1-38-ra, a raciométrikus érték $0,196 \pm 0,203$ volt (N=280). Ellentétben a szenzoros neuronokon kapott eredményekkel, a PACAP6-38-nak nem volt hatása a $[Ca^{2+}]_i$ -re. A PAC1 agonista maxadilán-szenzitív CHO sejtek relatív mennyisége $93 \pm 8,77\%$ volt ($R=0,325 \pm 0,229$) (N=198). A PAC1 receptor antagonista M65 nem okozott a kontrollhoz képest a sejtek szignifikánsan nagyobb hányadánál receptor aktivációt ($15,23 \pm 8,98\%$, $R=0,256 \pm 0,166$). A VPAC1 receptor szelektív agonista Ala^{11,22,28}VIP és a VPAC2 receptor agonista BAY 55-9837 nem okozott receptor aktivációt. Kontroll mérések folyamán a CHO sejtek $5,1 \pm 4,8\%$ -ában spontán Ca^{2+} szignált detektáltunk (32. A ábra). $[^{35}S]GTP\gamma S$ kötődési tesztel meghatároztuk a PACAP1-38 és a maxadilán hatásereőségét (EC_{50}): $1,24 \pm 0,1$, illetve $0,38 \pm 0,11$ nM. A PACAP6-38, VIP6-28 és M65 nem okoztak G-protein aktivációt (32. B ábra).

VPAC1 receptor-expresszáló sejtvonal

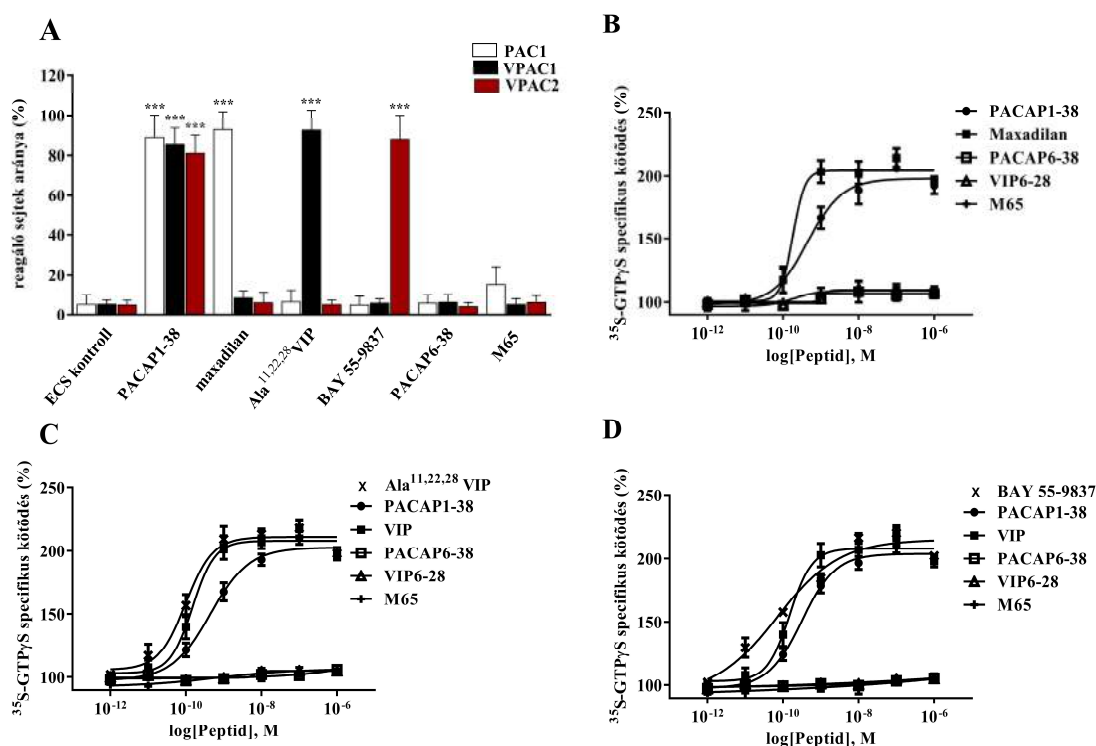
A vizsgált CHO sejtek $85,23 \pm 8,6\%$ -a válaszolt a PACAP1-38-ra, a raciométrikus érték $0,806 \pm 0,420$ volt (N=206). A szelektív VPAC1 receptor agonista Ala^{11,22,28}VIP-re a vizsgált sejtek $92,65 \pm 9,92\%$ -a válaszolt (N=172). A TRG neuronokkal ellentétben, VPAC1 receptor-expresszáló sejtvonalon a PACAP6-38, a maxadilán és az M65 sem váltott ki hatást. A VPAC2 receptor agonista BAY 55-9837 sem okozott receptor aktivációt. Kontroll körülmények között a CHO sejtek $5,23 \pm 2,23\%$ -ban spontán Ca^{2+} szignált detektáltunk (32. A ábra). $[^{35}S]GTP\gamma S$ kötődési tesztel meghatároztuk a PACAP1-38, a VIP és az Ala^{11,22,28}VIP hatásereőségét (EC_{50}): $1,21 \pm 0,1$, $0,4 \pm 0,11$, $0,26$

$\pm 0,13$ nM. A PACAP6-38, VIP6-28 és M65 nem okoztak G-protein aktivációt (32. C ábra).

VPAC2 receptor-expresszáló sejt vonal

A vizsgált CHO sejtek $81,9 \pm 9,2$ %-a válaszolt PACAP1-38-ra, a racimetrikus érték $0,241 \pm 0,218$ volt (N=113). A TRG neuronokkal ellentétben, VPAC2 receptor-expresszáló sejt vonalon a PACAP6-38, a maxadilan és az M65 sem váltott ki hatást. A szelektív VPAC1 receptor agonista Ala^{11,22,28}VIP sem okozott $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést, míg a szelektív VPAC2 receptor agonista BAY 55-9837 megnövelte $[Ca^{2+}]_i$ -t a CHO sejtek $87,98 \pm 12$ %-ánál, $R=0,293 \pm 0,215$ (N=175). A kontroll mérések során a CHO sejtek $4,87 \pm 2,36$ %-ánál spontán Ca^{2+} szignált detektáltunk (32. A ábra).

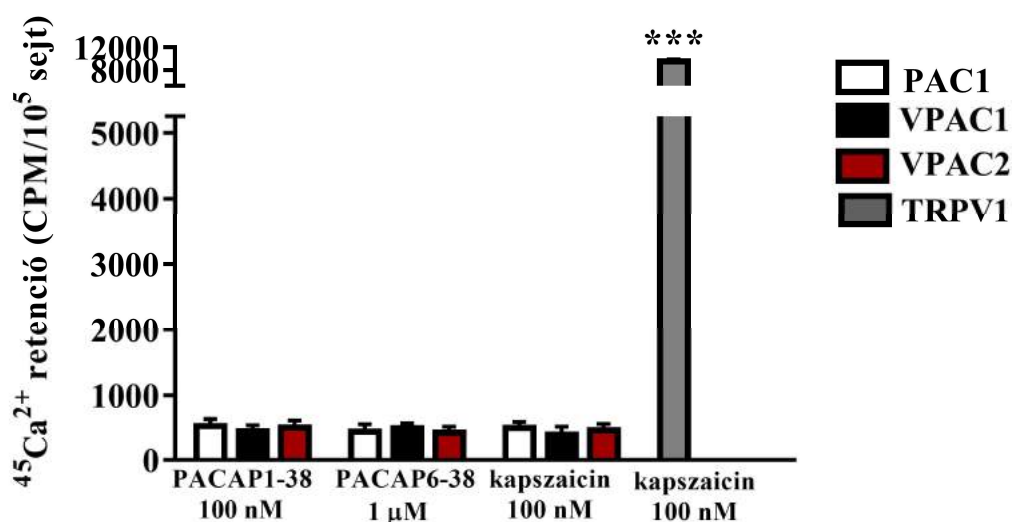
[³⁵S]GTP γ S kötődési teszttel meghatároztuk a PACAP1-38, a VIP és a BAY 55-9837 hatáserősségét (EC_{50}): $0,86 \pm 0,09$, $0,476 \pm 0,1$ és $0,2 \pm 0,14$ nM. A PACAP6-38, VIP6-28 és M65 nem okoztak G-protein aktivációt (32. D ábra).



32. ábra: PACAP receptor agonisták és antagonisták PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptor-expresszáló sejt vonalakra kifejtett hatása. (A) PACAP1-38-, PACAP6-38-, maxadilan-, M65-, Ala^{11,22,28}VIP-, BAY 55-9837-szenzitív CHO sejtek aránya (%), N=130-280 sejt/csoport. (***) $p < 0,001$, ECS vs. PACAP1-38, PACAP6-38, maxadilan, M65, Ala^{11,22,28}VIP, BAY 55-9837, egyutas ANOVA, Bonferroni post hoc teszt). Az oszlopok az átlag $\pm$ SEM értékeket reprezentálják. Specifikus [³⁵S]GTP γ S-kötődés (%) emelkedő koncentrációban alkalmazott PACAP agonista és antagonisták hatására (B) PAC1- (C) VPAC1- (D) VPAC2 receptor-expresszáló sejt vonalokon. A mérési pontok az átlag $\pm$ SEM értékeket reprezentálják.

6.3.3 Radioaktív $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvétel vizsgálatok TRPV1, PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptor-expresszáló sejtvonalakon

Ebben a kísérletsorozatban validáltuk a PACAP1-38 és PACAP6-38 specifikus hatását a PACAP receptorokon, valamint, hogy a Ca^{2+} nem ioncsatornán keresztül, nem-specifikus úton jut a sejtbe. Pozitív kontrollként a kapszaicin hatását vizsgáltuk TRPV1 receptor-expresszáló CHO sejteken, ahol a TRPV1 agonista hatására $^{45}\text{Ca}^{2+}$ intracelluláris akkumulációját detektáltuk. A kontroll körülmények között (Hank's oldat) mért 400-500 CPM értékhez képest kapszaicin hatására szignifikánsan emelkedett CPM értéket (9542 ± 342) határoztunk meg TRPV1 receptor-expresszáló CHO sejteken, ezzel szemben PACAP receptor-expresszáló sejtvonalakon a kapszaicin és a kontroll hatása között nem volt szignifikáns eltérés. PACAP1-38 és PACAP6-38 esetében sem detektáltunk szignifikáns különbséget a kontroll értékhez képest a $^{45}\text{Ca}^{2+}$ retenció tekintetében PACAP receptor-expresszáló sejtvonalakon (33. ábra).



33. ábra: PACAP1-38 és PACAP6-38 hatása a $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvételre PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptor-expresszáló CHO sejtvonalakon. PACAP1-38 (100 nM) és PACAP6-38 (1 μM) hatása PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptor-expresszáló CHO sejtvonalakon, valamint a kapszaicin hatása PAC1, VPAC1 és VPAC2 és TRPV1 receptor-expresszáló CHO sejtvonalakon $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvétel vizsgálatban. (*** $p < 0,001$, PACAP1-38, PACAP6-38 vs. kapszaicin, kétmintás t-próba) Az oszlopok az átlag $\pm$ SEM értékeket ábrázolják.

6.3.4 Összefoglalás

Az előző fejezetben ismertetett PACAP receptor agonisták és antagonisták vizsgálatának eredményeit TRG neuronokon és PACAP receptor-expresszáló sejtvonalakon az alábbi táblázat tartalmazza (4. táblázat).

	PRIMER SEJTKULTÚRÁK		PACAP RECEPTOR- EXPRESSZÁLÓ SEJTVONALAK		
	PATKÁNY TRG	EGÉR TRG	PAC1	VPAC1	VPAC2
PACAP1-38 pEC ₅₀	+	+	+	+	+
	7,34		8,90	8,91	9,07
PACAP1-27 pEC ₅₀	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
PACP6-38 pEC ₅₀	+	+	-	-	-
	7,13				
VIP pEC ₅₀	+	+	n.a.	+	+
				9,40	9,32
VIP6-28 pEC ₅₀	+	n.a.	-	-	-
maxadilan pEC ₅₀	+	+	+	-	-
			9,42		
Ala^{11,22,28}VIP pEC ₅₀	-	-	-	+	-
				9,59	
BAY 55-9837 pEC ₅₀	+	+	-	-	+
					9,70
M65 pEC ₅₀	+	+	-	-	-

4. táblázat: A PACAP agonisták és antagonisták hatásának összefoglalása. +: receptor aktiváció, -: nem történt receptor aktiváció, n.a.: nincs adat.

7. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

7.1 A lipid raft diszrupció hatása a TRP receptorok aktiválhatóságára

A koleszterin depletáló MCD-vel, a szfingolipid bioszintézis inhibitor myriocinnel, valamint a szfingomielint bontó szfingomielináz enzimmal létrehozott lipid raft diszrupció egyaránt gátolta a TRPV1 receptor aktivációt TRG neuronokon és TRPV1-transzfektált sejteken (Szőke és mtsai., 2010). A dolgozatban részletezett kísérletsorozatban az MCD, a myriocin és a szfingomielináz hatását további fájdalomérzékelésben részt vevő hőmérséklet-szenzitív TRP receptorok esetében is vizsgáltuk. Elsőként bizonyítottuk, hogy a fent leírt módszerekkel létrehozott lipid raft diszrupció (Kobayashi és mtsai., 2006; Kiyokawa és mtsai., 2005) szignifikánsan és koncentrációfüggő módon csökkentette a TRPA1 és a TRPM8 ioncsatorna nyitási valószínűségét, de nem volt hatással a TRPM3 receptor működésére. Az előkezelések gátolták a kapszaicin (TRPV1), az AITC, a formaldehid (TRPA1) és az icilin (TRPM8) hatására kialakuló Ca^{2+} válaszokat szenzoros neuronokon.

Az MCD kezelés koleszterin depletáló hatását két kísérleti elrendezésben is bizonyítottuk: koleszterin-kötő fluoreszcens festékekkel és fluoreszcencia spektroszkópia módszerével membránpolaritás-szenzitív próba segítségével.

Más kutatócsoportok eredményei szerint az MCD kezelés csökkent TRPV1 receptor aktivációt eredményezett DRG neuronokon, mely egybevág munkacsoportunk megfigyelésével (Liu és mtsai., 2006). Egy másik tanulmány alapján azonban a koleszterin deplécio nem befolyásolta a hő hatására létrejövő áramokat TRPV1-transzfektált HEK293 sejteken (Liu és mtsai., 2003). Bergdahl és mtsai. az MCD kezelést követően csökkent TRPC1 receptor függő raktár-vezérelt Ca^{2+} áramot detektáltak (Bergdahl és mtsai., 2003). Egy másik kutatócsoport bizonyította, hogy a membrán koleszterin tartalmának növelése stimulálja a TRPC3 receptor funkciót (Graziani és mtsai., 2006).

Bizonyítottuk, hogy a lipid raftok szerkezeti integritásának megbontása csökkenti az icilin-okozta TRPM8 receptor aktivációt. Egy korábbi tanulmány szerint azonban egér TRG sejteken és TRPM8-transzfektált sejtvonalon az MCD kezelés növelte a receptor mentol-érzékenységet (Morenilla-Palao és mtsai., 2009). A TRPM8 receptoron az icilin a mentolnál potensebb agonista, feltételezhetően különböző alloszterikus kötőhelyek léteznek a ligandumok számára. Ehhez hasonló jelenséget írt le kutatócsoportunk a TRPV1 receptor agonista kapszaicin és RTX esetében (Szőke és mtsai., 2010).

Kimutattuk, hogy a TRPM3 receptor működését érzőneuronokon a lipid raft diszrupció nem befolyásolta, melynek magyarázatául a receptor speciális szerkezeti jellemzői szolgálhatnak. A TRPM3 a TRP receptorokhoz hasonlóan nem-szelektív kationcsatorna, azonban számos aspektusban különbözik a TRP család tagjaitól (Oberwinkler és Philipp, 2014; Wagner és mtsai., 2008). A receptoron specifikus szteroid kötőhelyet karakterizáltak, így a pregnenolon-szulfát, az epipregnenolon-szulfát és a dihidro-D-eritro-szfingozin képes aktiválni a receptort (Drews és mtsai., 2014; Majeed és mtsai., 2010; Grimm és mtsai., 2005). A TRPM3 receptor különleges tulajdonsága, hogy jelenleg ismeretlen járulékos fehérjékkel stabil negyedleges szerkezetet képes kialakítani, mely formában rezisztens a lipid raft károsodásra (Drews és mtsai., 2014). Korábbi irodalmi adatok alapján, ellentétben a másik három termoszenzitív TRP receptorral, a TRPM3 receptor működését stimulálja az MCD-vel létrehozott koleszterin depléción. Ennek hátterében az állhat, hogy a receptor működését az endogén koleszterin részben gátolja (Drews és mtsai., 2014, Naylor és mtsai., 2010).

Az előkezelések közül a szfingomielinázra fókuszáltunk, mivel számos előnnyel rendelkezik a másik két lipid raft károsodást okozó vegyülethez képest: (1) hatása gyorsan kifejlődik, (2) lokális hatást fejt ki a plazmamembránban, (3) ismert metabolitjainak receptor működést befolyásoló hatása vizsgálható. A szfingomielináz kezelés a reagáló érzőneuronok arányának redukálása mellett csökkentette a kapszaicin, az AITC és az icilin hatására kifejlődő Ca^{2+} tranzienseket és megnövelte a válaszok latenciáidejét. Kimutattuk, hogy az érzőideg-végződéseken a szfingomielináz már alacsonyabb koncentrációban is képes gátolni a TRPV1 és a TRPA1 receptorok aktiválhatóságát, mint a sejttesteken. Ezzel a vizsgálattal elsőként bizonyítottuk, hogy a lipid raftok érzőideg-végződéseken is fontos szerepet töltenek be a vizsgált receptorok aktiválhatósága tekintetében.

KCl és thapsigargin alkalmazásával bizonyítottuk, hogy az enzim nem befolyásolja a feszültségfüggő kalcium csatornák működését, illetve hatása a belső membránokon nem érvényesül. A KCl-indukált $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedés hátterében feszültségfüggő kalium és kalcium csatornák is szerepet játszanak, ezek között vannak olyan csatornák melyekre gátló hatást gyakorol a lipid raft diszrupció, azonban szfingomielináz kezelés hatására a regisztrált $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nem változik. Korábbi tanulmányok szerint a koleszterin depléción eltérő hatást gyakorol a különböző feszültségfüggő ioncsatornákra: növeli a Cav2.1 áramokat tsA-201 sejtvonalon (Davies és mtsai., 2006), azonban gátolja a Kv3.1 áramokat NG108-15 sejteken (Huang és mtsai., 2011). A szfingomielináz által nem gátolt ioncsatornákon megvalósuló Ca^{2+} áram következtében emelkedett $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t detektáltunk.

A thapsigargin a $[Ca^{2+}]_i$ gyors növekedését okozza az endoplazmatikus retikulum (ER) Ca^{2+} -ATPáz specifikus és potens gátlásán keresztül (Thastrup és mtsai., 1990), melyet a szfingomielináz kezelés nem befolyásolt. Ezzel bizonyítottuk, hogy a szfingomielináz a belső membránok összetételét nem változtatja meg, hatása csak a plazmamembránban érvényesül. Az eredményeink azt mutatják, hogy a szfingomielin metabolitok (ceramid, szfingozin) TRG neuronokon, TRPV1 receptor-expresszáló CHO sejteken és perifériás érzőideg-végződéseken sem befolyásolták a TRPA1 és TRPV1 receptorok működését. Ezzel bizonyítékot szolgáltatunk arra nézve, hogy a szfingomielináz TRPV1 és TRPA1 receptor aktivációt gátló hatását nem a hidrolízis termékek okozzák.

Összefoglalva, az alkalmazott kísérleti rendszereinkben három termoszenzitivitást mutató és a fájdalomérzékelésben szerepet játszó TRP receptor (TRPV1, TRPA1, TRPM8) működése szoros kapcsolatban áll a lipid raftok szerkezeti integritásával. A receptorok és a lipid raftok hidrofób interakciói befolyásolják a csatornák nyitási valószínűségét. A lipid raft kutatás, valamint a receptorok nem-hidrofil kapcsolatainak feltérképezése a fenti eredmények birtokában nagyobb szerepet kaphat a receptorok farmakológiai vizsgálatában.

7.2 A hidrogén-szulfid donor vegyületek és a DMTS target molekulájának azonosítása

Mikrofluorimetriás méréssel bizonyítottuk a H_2S és a DMTS TRPA1 receptor agonista hatását érzőneuronokon, melyet patch-clamp módszerrel is megerősítettük TRPA1 receptor-expresszáló CHO sejteken. Az *in vitro* rendszerekben nyert adatok fontos kiindulópontjai az *in vivo* eredmények diszkussziójának.

Kutatócsoportunk eredményei alapján az egérfülön topikálisan alkalmazott NaHS kezelés a mikroerek vazodilatációját okozta, véráramlás fokozódást idézett elő. Az RTX előkezelés szignifikánsan csökkentette a H_2S donor vegyület hatására kialakuló mikrocirkuláció fokozódást. A CGRP receptor antagonist (BIBN4096) és a neuronikin 1 (NK_1) receptor antagonist (CP99994) koncentrációfüggő módon redukálta az NaHS által kiváltott vazodilatációt. A α -CGRP^{-/-} és NK_1 ^{-/-} egerek esetében a H_2S által előidézett értágulat kisebb mértékű volt, mint a vad típusú csoportokban. A K^+ _{ATP} csatorna blokkoló (glibenklamid) alkalmazása esetén mérsékeltebb értágulat alakult ki H_2S donor vegyület hatására. Ezen eredmények alapján a kapszaicin-szenzitív szenzoros neuronok fontos szerepet töltenek be a H_2S hatására kialakuló vazodilatáció mechanizmusában. A TRPA1 receptorok nagy számban expresszálódnak a kapszaicin-érzékeny érzőideg-

végződéseken. A receptorok H_2S általi aktivációja a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelésével szenzoros neuropeptidek exocitózist váltja ki a végződésből. A neurogén vazodilatációt az érőideg-végződésből felszabaduló gyulladásokeltő neuropeptidek, mint a CGRP és az SP mediálják CGPR illetve NK_1 receptorokon keresztül. Emellett a vaszkuláris simaizomsejteken a K^+_{ATP} csatornák aktivációja is hozzájárul az értágító hatáshoz, míg a pH és ozmotikus hatások nem játszanak szerepet a H_2S vazoaktív hatásának közvetítésében.

Kutatócsoportunk vizsgálta a DMTS hatását a hő-okozta mechanikai hiperalgéria modellben. DMTS hatására $\text{TRPA1}^{+/+}$ és $\text{sst}_4^{+/+}$ egerek esetében a mechanonociceptív hőküszöb értékek a kontroll csoportokhoz képest szignifikánsan kisebb mértékben csökkentek. A kialakult mechanikai hiperalgéria mértékét azonban nem változtatta meg a DMTS kezelés $\text{TRPA1}^{-/-}$ és $\text{sst}_4^{-/-}$ csoportokban. A DMTS antinociceptív hatásáért feltételezhetően az érőideg-végződésekből TRPA1 aktivációt követően felszabaduló szomatosztatin sst_4 receptoron keresztül megvalósuló hatása felelős. Az *in vitro* eredményeink is ezt a megállapítást erősítik. Ezen megfigyelések egybevágnak kutatócsoportunk korábbi eredményeivel, melyek a fájdalom és gyulladásos folyamatok sst_4 receptor-mediált komponensét bizonyítják (Helyes és mtsai., 2006). Eredményeink arra utalnak, hogy a DMTS nem befolyásolja a nyugalmi oxigénfogyasztást és a maghőmérsékletet. Szabadon mozgó állatoknál azonban erőteljes testhőmérséklet esést idézett elő, melynek magyarázatául a csökkent lokomotoros aktivitás szolgálhat. TRPA1 génhányos egerek esetében a DMTS ezen hatásai kisebb mértékben érvényesültek, mely a TRPA1 receptor fontos szerepét jelzi a poliszulfid vegyület hipotermiát és hipokinetikus választ kiváltó hatásának mediálásában.

7.3 A PACAP receptor agonisták és antagonisták hatásának vizsgálata

TRG neuronokon PACAP1-38, PACAP1-27, VIP, maxadilan és BAY 55-9837 hatására lassan emelkedő $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t detektáltunk, mely kinetika az intracelluláris raktárakból történő Ca^{2+} kiáramlás jellemzője. Hasonló karakterisztikus G-protein közvetített választ detektáltak korábban más kutatócsoportok PACAP1-38 hatására *hypophysis* sejteken és a szaglógumó szemcsesejtjein. (Yada és mtsai., 1993, Irwin és mtsai., 2015). Kísérleteinkben érdekes módon a számos modellben antagonistaként karakterizált PACAP6-38, M65 és VIP6-28 hatására érzőneuronokon Ca^{2+} válasz jött létre. A kontroll kísérleteket 3 lépésben végeztünk. Elsőként a ligandok szelektivitását teszteltük PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptor-expresszálo CHO sejt vonalakon. A PACAP1-38 mindhárom PACAP receptor-expresszálo sejt vonalon megnövelte a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t, míg a szelektív

agonisták receptor szelektitásuknak megfelelően váltottak ki hatást. Az érzőneuronokon kapott eredményeinkkel ellentétben a PACAP6-38, M65, VIP6-28 a PACAP receptor-expresszáló sejtvonalakon nem okozott $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést. A PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptor-expresszáló sejtvonalak membránpreperátumán folytatott $[^{35}S]GTP\gamma S$ kötődési teszt a PACAP1-38, maxadilán, Ala^{11,22,28}VIP, VIP és BAY 55-9837 koncentrációfüggő aktiváló hatását bizonyította a receptor szelektitásnak megfelelő sejtvonalon. Ezzel szemben PACAP6-38, M65 és VIP6-28 alkalmazásakor nem detektáltunk G-protein aktivációt. A kísérletek második fázisában a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés mechanizmusának meghatározása érdekében Ca^{2+} mentes ECS-ben is elvégeztük a vizsgálatokat. A Ca^{2+} hiányos közegben is detektálható Ca^{2+} válaszok bizonyítják, hogy a $[Ca^{2+}]_i$ növekedés hátterében specifikus mechanizmus, G-protein aktivációt követő intracelluláris raktárakból történő Ca^{2+} mobilizáció áll. A harmadik fázisban PACAP receptor-expresszáló sejtvonalakon végzett $^{45}Ca^{2+}$ felvétel vizsgálattal nem detektáltunk szignifikáns $^{45}Ca^{2+}$ retenciót PACAP1-38 és PACAP6-38 hatására. Ezzel további bizonyítékot szolgáltatunk arra nézve, hogy intracelluláris raktárakból történő Ca^{2+} felszabadulás felelős a PACAP receptorokon keresztül megvalósuló $[Ca^{2+}]_i$ emelkedésért.

A PACAP receptor antagonistaként karakterizált peptidek érzőneuronokon azonosított érdekes és ellentmondásos viselkedését más szövetekben és sejtekben is megfigyelték. A PACAP6-38 nem-konvencionális hatását kutatócsoportunk perifériás érzőidegvégződéseken bizonyította, emellett ezt a jelenséget MAPK jelátviteli utak esetében is leírták humán *cytothrophoblast* sejteken (Reglődi és mtsai., 2008). Számos élettani és patofiziológiai folyamatban a PACAP6-38 és a PACAP1-38 hasonló szerepet tölt be. Mindkét peptid serkenti a makrofágok fagocitáló aktivitását (Ichinose és mtsai., 1995), a porcképződést, valamint kondroprotektív hatásukat bizonyították oxidatív stressz folyamán (Juhász és mtsai., 2014). Egy újabb kutatási eredmény szerint a PACAP6-38 (1 μM) gyenge parciális agonista Cos-7 sejteken (Walker és mtsai., 2014).

A maxadilán fragmense az M65 PAC1 receptor specifikus antagonista, melyet ligand kötődési kísérletekkel bizonyítottak PAC1 receptor-expresszáló CHO sejteken (Uchida és mtsai., 1998). Újabb kutatások szerint azonban az M65 nem gátolta a PACAP1-38-indukált CGRP felszabadulást TNC-ből. Feltételezik, hogy a CGRP exocitózis nem a három ismert PACAP receptoron keresztül valósul meg, hanem ismeretlen, eddig még nem identifikált receptor létezését valószínűsítik a trigeminovaskuláris rendszerben. (Jansen-Olesen és mtsai., 2014). Eredményeink ezt a feltételezést erősítik.

A PACAP receptorok stimulációja Gs/Gq-protein közvetítésével az adenil-cikláz és a PLC rendszer aktivációjához vezet (Holighaus és mtsai., 2011). A PACAP receptorok által közvetített jelátviteli folyamatok komplexitását a nagyszámú splice variáns jelenléte növeli. A Gq-protein közvetítésével megvalósuló jelátvitel jellemzőbb a PAC1hop, mint a hip variánsoknál (Lutz és mtsai., 1999). A PLD stimuláció mechanizmusa is eltér a különböző receptor izoformák tekintetében, a PAC1hop variánsra ARF-függő, míg a PAC1null receptorra az ARF-független útvonal jellemző. Egyéb intracelluláris messengerek és jelátviteli útvonalak is szerepet játszanak a PACAP receptorok szignalizációs folyamataiban, mint a $[Ca^{2+}]_i$, diacilglicerol (DAG) (Vaudry és mtsai., 2009), továbbá járulékos fehérjék szerepét is leírták a jelátvitel folyamatában (Bockaert és mtsai., 2004, Couvineau és Laburthe 2012 a, b). A VIP $[Ca^{2+}]_i$ növekedést okozó hatásához hozzájárul, hogy a VPAC1 receptorok RAMP-pal intreakcióba léphetnek, mely kapcsolat emelkedett inozitol-triszfoszfát (IP_3) szintet eredményez (Dickson és Finlayson, 2009; Christopoulos és mtsai., 2003).

A G-protein-kapcsolt receptorokon megvalósuló szignáltranszdukció komplexitásához hozzájárulnak a G-protein-kapcsolt receptorok között kialakuló interakciók. (Pantaloni és mtsai., 1996; Dautzenberg és mtsai., 1999; Holighaus és mtsai., 2011). A G-protein-kapcsolt receptorok asszociációja révén létrejövő homo-és heteromerek (Rozenfeld és Devi, 2011) képesek egymás jelátviteli útvonalait szabályozni (Hur és Kim, 2002). Emellett a receptorok nem G-protein-kapcsolt receptorokkal is képesek interakcióba lépni (Couvineau és Laburthe, 2012 a, b). Mindezek alátámasztják az ún. „biased agonism” jeleséget, mely szerint a különböző agonisták eltérő receptor konformációváltozást indukálnak, ezzel különböző jelátviteli folyamatokat aktiválnak (Kenakin, 2011). Ezt a jelenséget PACAP receptorok esetén is leírták (Walker és mtsai., 2014).

A VPAC1 receptor szelektív agonista Ala^{11,22,28}VIP nem okozott szignifikáns $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést. Ennek hátterében állhat, hogy a VPAC2 és a PAC1 receptor számos izoformájának mRNS expresszióját kimutatták RT-PCR módszerrel patkány TRG sejteken, míg a VPAC1 receptor jelenlétét nem detektálták. Fehérjeszintű expressziót is csak a PAC1 és VPAC2 receptorok esetén bizonyítottak TRG neuronokon immunhisztokémiai módszerekkel (Chaudhary és Baumann, 2002).

In vitro kísérletekkel bizonyítékot szolgáltatunk arra nézve, hogy az antagonistaként karakterizált PACAP ligandumok potens agonista hatást fejtenek ki TRG neuronokon. Eredményeink alapján arra következtetünk, hogy jelenleg ismeretlen receptorok vagy splice variánsok eltérő jelátviteli utakat generálnak TRG sejtekben. A VPAC1 receptorok nem játszanak szerepet a PACAP hatásának közvetítésében érzőneuronokon. További

vizsgálatok szükségesek a PACAP-indukált trigeminovaskuláris aktiváció pontos mechanizmusának felderítése és új targetmolekulák azonosítása érdekében.

8. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Elsőként igazoltuk, hogy a TRPV1 receptor mellett további két hőmérséklet-érzékeny TRP receptor (TRPA1 és TRPM8) aktiválhatóságát is csökkenti a lipid raft diszrupció. Elsőként bizonyítottuk, hogy ez a jelenség TRPV1 és TRPA1 receptorok esetében nemcsak a sejtesteken, hanem az érzőideg-végződéseken is megvalósul. A TRPM3 receptor működésére azonban nem volt hatással a lipid raft károsodás. Eredményeink azt a feltételezést erősítik, mely szerint a TRPM3 receptort jelenleg ismeretlen járulékos fehérjék stabilizálják, így aktiválhatóságát nem gátolja a lipid raftok szerkezetének megbontása. Eredményeink alapján arra következtetünk, hogy a receptorműködés szabályozásában fontos szerepet játszanak a hidrofób kapcsolatok. Ezen megfigyelések nyomán felmerül egy alternatív gyógyszerfejlesztési szemlélet, irányvonal lehetősége, melyhez elengedhetetlen a ligandum-receptor interakcióban a nemhidrofil kapcsolatok vizsgálata. A lipid raftok és a TRP receptorok kapcsolatrendszerének további tanulmányozása fontos alapkísérletes megközelítése lehet a receptorműködés befolyásolásának, mely új gyógyszer-célpontok azonosításához vezethet.

2. Meghatároztuk a DMTS target molekuláját érzőneuronokon. Elsőként bizonyítottuk, hogy a DMTS a H₂S donor vegyületekhez hasonlóan TRPA1 receptor aktivációt okoz TRG sejteken. A vegyület TRPA1 agonista hatását TRPA1 receptor-expresszáló sejtvonalon is bizonyítottuk. A célmolekula azonosítása hozzájárul a poliszulfidok hatásmechanizmusának pontosabb megismeréséhez.

3. Igazoltuk a PACAP1-38, PACAP1-27, VIP, maxadilan, BAY 55-9837 agonista hatását TRG neuronokon. Elsőként írtuk le, hogy az irodalomban számos helyen antagonistaként karakterizált PACAP6-38, VIP6-28 és M65 érzőneuronokon az agonistákhoz hasonlóan Ca²⁺ szignált indukálnak, azaz hatást közvetítenek. Ezzel a megfigyeléssel ellentétben, PACAP receptor-expresszáló sejtvonalakon nem mutatnak hasonló viselkedést. Bizonyítottuk, hogy szenzoros neuronokon a PACAP hatásának közvetítésében a PAC1 és VPAC2 receptorok játszanak szerepet, a VPAC1 receptorok azonban nem. Eredményeink alapján alternatív kötőhelyek létezését feltételezzük a receptorokon, illetve eddig ismeretlen receptor izoformák expresszióját valószínűsítjük érzőneuronokon. Megfigyeléseink felvethetik új, eddig még ismeretlen receptorok létezését.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a fájdalomfolyamatban részt vevő receptorokat befolyásolni képes endogén vegyületek gyógyszerfejlesztési potenciállal bírhatnak. Emellett fontosnak tartjuk a receptorokat körülvevő hidrofób mikrokörnyezet vizsgálatát. A neuropátiás fájdalom, valamint a migrén patomechanizmusának pontos feltérképezése, célmolekulák azonosítása alapvető fontosságú. Kutatócsoportunk és más munkacsoportok állatkísérletes és humán vizsgálatai is igazolják a PACAP fontos szerepét migrén kialakulásában. A jelen dolgozatban leírt eredmények a PACAP receptor antagonisták irodalmi adatoktól eltérő viselkedését bizonyítják érzőneuronokon. Mivel a PACAP szerepe vitathatatlan a trigeminovaskuláris rendszer aktivációjában, ezen eredmények birtokában nagy szükség van új, kis molekulájú szelektív PAC1 és VPAC2 antagonisták fejlesztésére, melyek fontos szerepet kaphatnak a migrénes fájdalom csillapításában.

9. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

Anderson R.G., Jacobson K. (2002). A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science*. 296: 1821-1825.

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

Andersson D.A., Gentry C., Bevan S. (2012). TRPA1 has a key role in the somatic pro-nociceptive actions of hydrogen sulfide. *PLoS One* 7: e46917.

Arimura A. (1998). Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. *Jpn. J. Physiol.* 48: 301–331.

Arimura A., Somogyvári-Vígh A., Miyata A., Mizuno K., Coy D.H., Kitada C. (1991). Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: Highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinol.* 129: 2787–2789.

Atoyan R., Shander D., Botchkareva N.V. (2009). Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin. *J. Invest. Derm.* 129: 2312–2315.

Bai A.P., Ouyang Q., Hu R.W. (2005). Diallyl trisulfide inhibits tumor necrosis factor-alpha expression in inflamed mucosa of ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.* 50: 1426-1431.

Bandell M., Story G.M., Hwang S.W., Viswanath V., Eid S.R., Petrus M.J., Earley T.J., Patapoutian A. (2004). Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron*. 41: 849–857.

Bandell M., Dubin A.E., Petrus M.J., Orth A., Mathur J., Hwang S.W., Patapoutian A. (2006). High-throughput random mutagenesis screen reveals TRPM8 residues specifically required for activation by menthol. *Nat. Neurosci.* 9: 493–500.

Bari M., Battista N., Fezza F., Finazzi-Agrò A., Maccarrone M. (2005). Lipid rafts control signaling of type-1 cannabinoid receptors in neuronal cells: implications for anandamide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 280: 12212–12220.

Barthó L., Lázár Z., Lénárd L., Benkó R., Tóth G., Penke B., Szolcsányi J., Maggi C.A. (2000). Evidence for the involvement of ATP, but not of VIP/PACAP or nitric oxide, in the excitatory effect of capsaicin in the small intestine. *Eur. J. Pharmacol.* 392: 183-188.

Bautista D.M., Movahed P., Hinman A., Axelsson H.E., Sterner O., Hogestatt E.D., Julius D., Jordt S.E., Zygmunt P.M. (2005). Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 12248 –12252.

Bautista D.M., Siemens J., Glazer J.M., Tsuruda P.R., Basbaum A.I., Stucky C.L., Jordt S.E., Julius D. (2007). The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature*. 448: 204–208.

Bánki E., Pakai E., Gaszner B., Zsiborás C., Czett A., Bhuddi P.R., Hashimoto H., Tóth G., Tamás A., Reglődi D., Garami A. (2014). Characterization of the thermoregulatory response to pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in rodents. *J. Mol. Neurosci.* 54: 543-554.

Bergdahl A., Gomez M.F., Dreja K., Xu S.Z., Adner M., Beech D.J., Broman J., Hellstrand P., Sward K. (2003). Cholesterol depletion impairs vascular reactivity to endothelin-1 by reducing store-operated Ca^{2+} entry dependent on TRPC1. *Circ. Res.* 93: 839–847.

Bevan S., Hothi S., Hughes G., James I.F., Rang H.P., Shah K., Walpole C.S., Yeats J.C. (1992). Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br. J. Pharmacol.* 107: 544-552.

- Bhatia M., Sidhapuriwala J., Moochhala S.M., Moore P.K. (2005). Hydrogen sulphide is a mediator of carrageenan-induced hindpaw oedema in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 145: 141–144.
- Bini L., Pacini S., Liberatori S., Valensin S., Pellegrini M., Raggiaschi R., Pallini V., Baldari C.T. (2003). Extensive temporally regulated reorganization of the lipid raft proteome following T-cell antigen receptor triggering. *Biochem. J.* 369: 301-309.
- Blackstone E., Morrison M., Roth M.B. (2005). H₂S induces a suspended animation-like state in mice. *Science.* 308: 518.
- Blumberg P.M., Szállási A., Ács G. (1993). Resiniferatoxin – an ultrapotent capsaicin analogue. In: Wood J.N. (Ed.) *Capsaicin in the Study of Pain*. Academic Press, London. pp. 45-62.
- Bockaert J., Fagni L., Dumuis A., Marin P. (2004). GPCR interacting proteins (GIP). *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 33: 32-41.
- Bojnik E., Magyar A., Tóth G., Bajusz S., Borsodi A., Benyhe S. (2009). Binding studies of novel, non-mammalian enkephalins, structures predicted from frog and lungfish brain cDNA sequences. *Neurosci.* 158: 867-874.
- Boni L.J., Ploug K.B., Olesen J., Jansen-Olesen I., Gupta S. (2009). The in vivo effect of VIP, PACAP-38 and PACAP-27 and mRNA expression of their receptors in rat middle meningeal artery. *Cephalalgia.* 29: 837-847.
- Bourgault S., Vaudry D., Botia B., Couvineau A., Laburthe M., Vaudry H., Fournier A. (2008). Novel stable PACAP analogs with potent activity towards the PAC1 receptor. *Peptides.* 29: 919-932.
- Brown D.A., London E. (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 275: 17221-17224.
- Ufret-Vincenty C.A., Klein R.M., Hua L., Angueyra J., Gordon S.E. (2011). Localization of the PIP₂ sensor of TRPV1 ion channels. *J. Biol. Chem.* 286: 9688–9698.
- Caterina M.J., Schumacher M.A., Tominaga M., Rosen T.A., Levine J.D., Julius D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channels in the pain pathway. *Nature.* 389: 816-824.
- Caterina M.J., Julius D. (2001). The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 487-517.
- Chao L., Chen F., Jensen K.F., Hatton T.A. (2011). Two-dimensional solvent-mediated phase transformation in lipid membranes induced by sphingomyelinase. *Langmuir* 27: 10050–10060.
- Chattopadhyay M., Kodela R., Nath N., Barsegian A., Boring D., Kashfi K. (2012). Hydrogen sulfide-releasing aspirin suppresses NF-kappaB signaling in estrogen receptor negative breast cancer cells in vitro and in vivo. *Biochem. Pharmacol.* 83: 723–732.
- Chaudhary P., Baumann T.K. (2002). Expression of VPAC2 receptor and PAC1 receptor splice variants in the trigeminal ganglion of the adult rat. *Mol. Brain. Res.* 104: 137–142.
- Chen J. (2015). The evolutionary divergence of TRPA1 channel: heat-sensitive, cold-sensitive and temperature-insensitive. *Temperature.* 2: 158-159.
- Christiansen T., Bruun A., Knight Y.E., Goadsby P.J., Edvinsson L. (2003). Immunoreactivity of NOS, CGRP, PACAP, SP and VIP in the trigeminal nucleus caudalis and in the cervical spinal cord C1 and C2 of the cat. *J. Headache Pain.* 4: 156-163.
- Christopoulos A., Christopoulos G., Morfis M., Udawela M., Laburthe M., Couvineau A., Kuwasako K., Tilakaratne N., Sexton P.M. (2003). Novel receptor partners and function of receptor activity-modifying proteins. *J. Biol. Chem.* 278: 3293-3297.

- Chu C.J., Huang S.M., De Petrocellis L., Bisogno T., Ewing S.A., Miller J.D., Zipkin R.E., Daddario N., Appendino G., Di Marzo V., Walker J.M. (2003). N-oleoyl-dopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. *J. Biol. Chem.* 278: 13633–13639.
- Chuang H.H., Neuhausser W.M., Julius D. (2004). The super-cooling agent icilin reveals a mechanism of coincidence detection by a temperature-sensitive TRP channel. *Neuron*. 43: 859–869.
- Couvineau A., Laburthe M. (2012a). The family B1 GPCR: structural aspects and interaction with accessory proteins. *Curr. Drug Targets*. 13: 103-115.
- Couvineau A., Laburthe M. (2012b). VPAC receptors: structure, molecular pharmacology and interaction with accessory proteins. *Br. J. Pharmacol.* 166: 42-50.
- da Costa D. S., Meotti F.C., Andrade E.L., Leal P.C., Motta E.M., Calixto J.B. (2010). The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. *Pain*. 148: 431–437.
- Dai Y., Wang S., Tominaga M., Yamamoto S., Fukuoka T., Higashi T., Kobayashi K., Obata K., Yamanaka H., Noguchi K. (2007). Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. *J. Clin. Invest.* 117: 1979–1987.
- Dautzenberg F.M., Mevenkamp G., Wille S., Hauger R.L. (1999). N-terminal splice variants of the type I PACAP receptor: isolation, characterization and ligand binding/selectivity determinants. *J. Neuroendocrinol.* 11: 941-949.
- Davies A., Douglas L., Hendrich J., Wratten J., Tran Van Minh A., Foucault I., Koch D., Pratt W.S., Saibil H.R., Dolphin A.C. (2006). The calcium channel $\alpha 2\delta$ -2 subunit partitions with CaV2.1 into lipid rafts in cerebellum: implications for localization and function. *J. Neurosci.* 26: 8748–8757.
- Davis-Taber R., Baker S., Lehto S.G., Zhong C., Surowy C.S., Faltynek C.R., Scott V.E., Honore P. (2008). Central pituitary adenylate cyclase 1 receptors modulate nociceptive behaviors in both inflammatory and neuropathic pain states. *J. Pain*. 9: 449-456.
- Dickinson T., Fleetwood-Walker S.M., Mitchell R., Lutz E.M. (1997). Evidence for roles of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) receptors in modulating the responses of rat dorsal horn neurons to sensory inputs. *Neuropeptides*. 31: 175-185.
- Dickson L., Aramori I., McCulloch J., Sharkey J., Finlayson K. (2006). A systematic comparison of intracellular cyclic AMP and calcium signalling highlights complexities in human VPAC/PAC receptor pharmacology. *Neuropharmacology*. 51: 1086-1098.
- Dickson L., Finlayson K. (2009). VPAC and PAC receptors: From ligands to function. *Pharmacol. Ther.* 121: 294-316.
- Docherty R.J., Yeats J.C., Bevan S., Boddeke H.W. (1996). Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin-evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. 431: 828–837.
- Drews A., Mohr F., Rizun O., Wagner T.F., Dembla S., Rudolph S., Lambert S., Konrad M., Philipp S.E., Behrendt M., Marchais-Oberwinkler S., Covey D.F., Oberwinkler J. (2014). Structural requirements of steroidal agonists of transient receptor potential melastatin 3 (TRPM3) cation channels. *Br. J. Pharmacol.* 171: 1019–1032.
- Eberhardt M.J., Filipovic M.R., Leffler A., de la Roche J., Kistner K., Fischer M.J., Fleming T., Zimmermann K., Ivanovic-Burmazovic I., Nawroth P.P., Bierhaus A., Reeh P.W., Sauer S.K. (2012). Methylglyoxal activates nociceptors through transient receptor potential channel A1 (TRPA1): a possible mechanism of metabolic neuropathies. *J. Biol. Chem.* 287: 28291–28306.
- Fahrenkrug J., Hannibal J. (1998). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide immunoreactivity in capsaicin-sensitive nerve fibres supplying the rat urinary tract. *Neuroscience*. 83: 1261-1272.

- Gaudin P., Couvineau A., Maoret J.J., Rouyer-Fessard C., Laburthe M. (1996). Stable expression of the recombinant human VIP1 receptor in clonal Chinese hamster ovary cells: pharmacological, functional and molecular properties. *Eur. J. Pharmacol.* 302: 207–214.
- Gaudet R. (2008). TRP channels entering the structural era. *J. Physiol.* 586: 3565–3575.
- Gaus K., Gratton E., Kable E.P.W., Jones A.S., Gelissen I., Kritharides L. (2003). Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 15554–15559.
- Gourlet P., Vandermeers A., Van Rampelbergh J., De Neef P., Cnudde J., Waelbroeck M., Robberecht P. (1998). Analogues of VIP, helodermin and PACAP discriminate between rat and human VIP1 and VIP2 receptors. *Ann. N Y Acad. Sci.* 865: 247–252.
- Ghatei M.A., Takahashi K., Suzuki Y., Gardiner J., Jones P.M., Bloom S.R. (1993). Distribution, molecular characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its precursor encoding messenger RNA in human and rat tissues. *J. Endocrinol.* 136: 159–166.
- Golfetto O., Hinde E., Gratton E. (2013). Laurdan fluorescence lifetime discriminates cholesterol content from changes in fluidity in living cell membranes. *Biophys. J.* 104: 1238–1247.
- Graziani A., Rosker C., Kohlwein S.D., Zhu M.X., Romanin C., Sattler W., Groschner K., Poteser M. (2006). Cellular cholesterol controls TRPC3 function: evidence from a novel dominant-negative knockdown strategy. *Biochem. J.* 396: 147–155.
- Grimm C., Kraft R., Sauerbruch S., Schultz G., Harteneck C. (2003). Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3. *J. Biol. Chem.* 278: 21493–21501.
- Grimm C., Kraft R., Schultz G., Harteneck C. (2005). Activation of the melastatin-related cation channel TRPM3 by d-erythro-sphingosine. *Mol. Pharmacol.* 67: 798–805.
- Guirland C., Suzuki S., Kojima M., Lu B., Zheng J.Q., Grimm C., Kraft R., Sauerbruch S., Schultz G., Harteneck C. (2004). Lipid rafts mediate chemotropic guidance of nerve growth cones. *Neuron.* 42: 51–62.
- Gunthorpe M.J., Benham C.D., Randall A., Davis J.B. (2002). The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 23: 183–191.
- Guo W., Cheng Z.Y., Zhu Y.Z. (2013). Hydrogen sulfide and translational medicine. *Acta Pharmacol. Sin.* 34: 1284–1291.
- Hannibal J., Ekblad E., Mulder H., Sundler F., Fahrenkrug J. (1998). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the gastrointestinal tract of the rat: distribution and effects of capsaicin or denervation. *Cell. Tissue. Res.* 291: 65–79.
- Hannibal J. (2006). Roles of PACAP-containing retinal ganglion cells in circadian timing. *Int. Rev. Cytol.* 251: 1–39.
- Harris F.M., Best K.B., Bell J.D. (2002). Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochim. Biophys. Acta.* 1565: 123–128.
- Hatakeyama Y., Takahashi K., Tominaga M., Kimura H., Ohta T. (2015). Polysulfide evokes acute pain through the activation of nociceptive TRPA1 in mouse sensory neurons. *Mol. Pain.* 11: 24.
- Helyes Zs., Németh J., Pintér E., Szolcsányi J. (1997). Inhibition by nociceptin of neurogenic inflammation and the release of SP and CGRP from sensory nerve terminals. *Br. J. Pharmacol.* 121: 613–615.
- Helyes Zs., Thán M., Oroszi G., Pintér E., Németh J., Kéri Gy., Szolcsányi J. (2000). Anti-nociceptive effect induced by somatostatin released from sensory nerve terminals and by synthetic somatostatin analogues in the rat. *Neurosci. Lett.* 278: 185–188.

- Helyes Zs., Pintér E., Németh J., Kéri Gy., Thán M., Oroszi G., Horváth A., Szolcsányi J. (2001). Anti-inflammatory effect of synthetic somatostatin analogues in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 134: 1571-1579.
- Helyes Zs., Pintér E., Németh J., Szolcsányi J. (2003). Pharmacological targets for the inhibition of neurogenic inflammation. *Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents in Curr. Med. Chem.* 2: 191-218.
- Helyes Zs., Pintér E., Németh J., Sándor K., Elekes K., Szabó A., Pozsgai G., Keszthelyi D., Kereskai L., Engström M., Wurster S., Szolcsányi J. (2006). Effects of the somatostatin receptor subtype 4 selective agonist J-2156 on sensory neuropeptide release and inflammatory reactions in rodents. *Br. J. Pharmacol.* 149: 405-415.
- Helyes Zs., Pozsgai G., Börzsei R., Németh J., Bagoly T., Márk L., Pintér E., Tóth G., Elekes K., Szolcsányi J., Reglodi D. (2007). Inhibitory effect of PACAP-38 on acute neurogenic and non-neurogenic inflammatory processes in the rat. *Peptides*. 28: 1847-1855.
- Hering H., Lin C.C., Sheng M.J. (2003) Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *Neurosci.* 23: 3262-3271.
- Hinman A., Chuang H.H., Bautista D.M., Julius D. (2006). TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 19564-19568.
- Högyes A. (1878). Beitrage zur physiologischen Wirkung der Bestandteile des Capsicum anuum. *Exp. Panthol. Pharmacol.* 9: 117-130.
- Holighaus I., Mustafa T., Eiden L.E. (2011). PAC1hop, null and hip receptors mediate differential signaling through cyclic AMP and calcium leading to splice variant specific gene induction in neural cells. *Peptides*. 32: 1647–1655.
- Huang C.W., Wu Y.J., Wu S.N. (2011). Modification of activation kinetics of delayed rectifier K⁺ currents and neuronal excitability by methyl—cyclodextrin. *Neuroscience*. 176: 431–441.
- Hur E.M., Kim K.T. (2002). G protein-coupled receptor signalling and cross-talk: achieving rapidity and specificity. *Cell Signal.* 14: 397–405.
- Ichinose M., Asai M., Imai K., Sawada M. (1995). Enhancement of phagocytosis in mouse macrophages by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and related peptides. *Immunopharmacology*. 30: 217–224.
- Irving G.A., Backonja M.M., Duntzman E., Blonsky E.R., Vanhove G.F., Lu S.P., Tobias J., NGX-4010 C117 Study Group. (2011). A multicentre, randomized, double-blind, controlled study of NGX-4010, a high-concentration capsaicin patch, for the treatment of postherpetic neuralgia. *Pain Med.* 12: 99–109.
- Irwin M., Greig A., Tvrdik P., Lucero M.T. (2015). PACAP modulates of calcium ion activity in developing granule cells of the neonatal olfactory bulb. *J. Neurophysiol.* 113: 1234-1248.
- James I.F., Walpole C.S., Hixon J., Wood J.N., Wrigglesworth R. (1988). Long-lasting agonist activity produced by a capsaicin-like photoaffinity probe. *Mol. Pharmacol.* 33: 643-649.
- Jancsó N. (1960). Role of nerve terminals in the mechanism of inflammatory reactions. *Bull. Millard. Fillmore. Hosp. Buffalo. NY.* 7: 53-77.
- Jancsó N., Jancsó-Gábor A., Szolcsányi J. (1967). Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br. J. Pharmacol.* 31: 138-151.
- Jancsó N., Jancsó-Gábor A., Szolcsányi J. (1968). The role of sensory nerve endings in neurogenic inflammation induced in human skin and in the eye and paw of the rat. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 33: 32-41.
- Jansen-Olesen I., Baun M., Amrutkar D.V., Ramachandran R., Christophersen D.V., Olesen J. (2014). PACAP-38 but not VIP induces release of CGRP from trigeminal nucleus caudalis via a receptor distinct from the PAC1 receptor. *Neuropeptides*. 48: 53-64.

- Joo K.M., Chung Y.H., Kim M.K., Nam R.H., Lee B.L., Lee K.H., Cha C.I. (2004). Distribution of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptor) in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 476: 388-413.
- Jordt S.E., Bautista D.M., Chuang H.H., McKemy D.D., Zygmunt P.M., Högestätt E.D., Meng I.D., Julius D. (2004). Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature.* 427: 260–265.
- Jordt S.E., Julius D. (2002). Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell.* 108: 421-430.
- Jordt S.E., Tominaga M., Julius D. (2000). Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 8134-8139.
- Juhász T., Matta C., Katona É., Somogyi C., Takács R., Gergely P., Csernoch L., Panyi G., Tóth G., Reglődi D., Tamás A., Zákány R. (2014). Pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide (PACAP) signalling exerts chondrogenesis promoting and protecting effects: implication of calcineurin as a downstream target. *PLoS One.* 9:e91541.
- Jung J., Shin J.S., Lee S.Y., Hwang S.W., Koo J., Cho H., Oh U. (2004). Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *The Journal of Biological Chemistry.* 279: 7048–7054.
- Kannan K.B., Barlos D., Hauser C.J. (2007). Free cholesterol alters lipid raft structure and function regulating neutrophil. *J. Immunol.* 178: 5253-5261.
- Kenakin T. (2011). Functional selectivity and biased receptor signaling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 336: 296-302.
- Kimura Y., Mikami Y., Osumi K., Tsugane M., Oka J., Kimura H. (2013). Polysulfides are possible H_2S -derived signaling molecules in rat brain. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 27: 2451-2457.
- Kimura H. (2014). Hydrogen sulfide and polysulfides as biological mediators. *Molecules.* 19:16146-16157.
- Kiyokawa E., Baba T., Otsuka N., Makino A., Ohno S., Kobayashi T. (2005). Spatial and functional heterogeneity of sphingolipid-rich membrane domains. *J. Biol.Chem.* 280: 24072–24084.
- Kobayashi T., Takahashi M., Nagatsuka Y., Hirabayashi Y. (2006). Lipid rafts: new tools and a new component. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 1526–1531.
- Kochukov M.Y., McNearney T.A., Fu Y., Westlund K.N. (2006). Thermosensitive TRP ion channels mediate cytosolic calcium response in human synoviocytes. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 291: 424-432.
- Koplas P.A., Rosenberg R.L., Oxford G.S. (1997). The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.* 17: 3525-3537.
- Laburthe M., Couvineau A. (2002). Molecular pharmacology and structure of VPAC receptors for VIP and PACAP. *Regulatory Peptides.* 108: 165–173.
- Laburthe M., Couvineau A., Tan V. (2007). Class II G-protein-coupled receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology. *Peptides.* 28: 1631-1639.
- Laing R.J., Dhaka A. (2016). ThermoTRPs and Pain. *Neuroscientist.* 22: 171-187.
- Lerner E.A., Ribeiro J.M., Nelson R.J., Lerner M.R. (1991). Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J. Biol. Chem.* 266: 11234–11236.
- Li L., Bhatia M., Zhu Y.Z., Zhu Y.C., Ramnath R.D., Wang Z.J., Anuar F.B.M., Whiteman M., Salto-Tellez M., Moore P.K. (2005). Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide induced inflammation in the mouse. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 19: 1196–1198.

- Linden D.R., Levitt M.D., Farrugia G., Szurszewski J.H. (2010). Endogenous production of H₂S in the gastrointestinal tract still in search of a physiologic function. *Antioxidants Redox Signaling*. 12: 1135–1146.
- Liu B., Hui K., Qin F. (2003). Thermodynamics of heat activation of single capsaicin ion channels VR1, *Biophys. J.* 85: 2988–3006.
- Liu L., Simon S.A. (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.
- Liu M., Huang W., Wu D., Priestley J.V. (2006). TRPV1, but not P2 × 3, requires cholesterol for its function and membrane expression in rat nociceptors. *Eur. J. Neurosci.* 24: 1–6.
- Liu Y.Y., Sparatore A., Del Soldato P., Bian JS. (2011). ACS84, a novel hydrogen sulfide-releasing compound, protects against amyloid β-induced cell cytotoxicity. *Neurochem. Int.* 58: 591–598.
- Lockwich T.P., Liu X., Singh B.B., Jadowiec J., Weiland S., Ambudkar I.S. (2000). Assembly of Trp1 in a signaling complex associated with caveolin-scaffolding lipid raft domains. *J. Biol. Chem.* 275: 11934–11942.
- Lutz E.M., MacKenzie C.J., Johnson M., West K., Morrow J.A., Harmar A.J., Mitchell R. (1999). Domains determining agonist selectivity in chimaeric VIP2 (VPAC2)/PACAP (PAC1) receptors. *Br. J. Pharmacol.* 128: 934–940.
- Macpherson L.J., Dubin A.E., Evans M.J., Marr F., Schultz P.G., Cravatt B.F., Patapoutian A. (2007). Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature*. 445: 541–545.
- Maggi C.A., Meli A. (1988). The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen. Pharmacol.* 19: 1–43.
- Majeed Y., Agarwal A.K., Naylor J., Seymour V.A., Jiang S., Muraki K., Fishwick C.W., Beech D.J. (2010). Cis-isomerism and other chemical requirements of steroidal agonists and partial agonists acting at TRPM3 channels. *Br. J. Pharmacol.* 161: 430–441.
- Manes S., del Real G., Martinez-A C. (2003). Pathogens: raft hijackers. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 557–568.
- Markovics A., Kormos V., Gaszner B., Lashgarara A., Szoke E., Sandor K., Szabadfi K., Tuka B., Tajti J., Szolcsanyi J., Pinter E., Hashimoto H., Kun J., Reglodi D., Helyes Zs. (2012). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide plays a key role in nitroglycerol-induced trigeminovascular activation in mice. *Neurobiol. Dis.* 45: 633–644.
- Markowitz S., Saito K., Moskowitz M.A. (1987). Neurogenically mediated leakage of plasma protein occurs from blood vessels in dura mater but not brain. *J. Neurosci.* 7: 4129–4136.
- Matsunami M., Kirishi S., Okui T., Kawabata A. (2011). Chelating luminal zinc mimics hydrogen sulfide-evoked colonic pain in mice: possible involvement of T-type calcium channels. *Neuroscience*. 181: 257–264.
- May V., Beaudet M.M., Parsons R.L., Braas K.M. (2000). PACAP modulates rat sympathetic neuron depolarization through IP. *Ann.N.Y. Acad. Sci.* 921: 186–194.
- McIntyre P., McLatchie L.M., Chambers A., Phillips E., Clarke M., Savidge J., Toms C., Peacock M., Shah K., Winter J., Weerasakera N., Webb M., Rang H.P., Bevan S., James I.F. (2001). Pharmacological differences between the human and rat vanilloid receptor 1 (VR1). *Br. J. Pharmacol.* 132: 1084–1094.
- McKemy D.D., Neuhausser W.M., Julius D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*. 416: 52–58.
- McNamara C.R., Mandel-Brehm J., Bautista D.M., Siemens J., Deranian K.L., Zhao M., Hayward N.J., Chong J.A., Julius D., Moran M.M., Fanger C.M., TRPA1 mediates formalin-induced pain. (2007). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104: 13525–13530.

- Mikkelsen J.D., Hannibal J., Fahrenkrug J., Larsen P.J., Olcese J., McArdle C. (1995). Pituitary adenylate cyclase activating peptide-38 (PACAP-38), PACAP-27, and PACAP related peptide (PRP) in the rat median eminence and pituitary. *J. Neuroendocrin.* 7: 47–55.
- Mishra S., Joshi P.G. (2007). Lipid raft heterogeneity: an enigma. *J. Neurochem.* 103: 135-142.
- Miyake Y., Kozutsumi Y., Nakamura S., Fujita T., Kawasaki T. (1995). Serinepalmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant. ISP-1/Myriocin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211: 396–403.
- Miyamoto R., Otsuguro K., Ito S. (2011). Time- and concentration-dependent activation of TRPA1 by hydrogen sulfide in rat DRG neurons. *Neurosci. Lett.* 499: 137-142.
- Miyamoto R., Otsuguro K., Yamaguchi S., Ito S. (2014). Contribution of cysteine aminotransferase and mercaptopyruvate sulfurtransferase to hydrogen sulfide production in peripheral neurons. *J. Neurochem.* 130: 29-40.
- Miyamoto R., Otsuguro K., Yamaguchi S., Ito S. (2015). Neuronal regulation of expression of hydrogen sulfide-producing enzyme cystathionine β -synthase in rat spinal cord astrocytes. *Neurosci. Res.* 97: 52-59.
- Miyata A., Arimura A., Dahl R.R., Minamino N., Uehara A., Jiang L., Culler M.D., Coy D. H. (1989). Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 567-574.
- Mohapatra D.P., Nau C. (2003). Desensitization of capsaicin-activated currents in the vanilloid receptor TRPV1 is decreased by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. *The Journal of Biological Chemistry.* 278: 50080–50090.
- Mohapatra D.P., Nau C. (2005). Regulation of Ca^{2+} -dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry.* 280: 13424–13432.
- Moller K., Zhang Y.Z., Hakanson R., Luts A., Sjölund B., Uddman R., Sundler F. (1993). Pituitary adenylate cyclase activating peptide is a sensory neuropeptide: Immunocytochemical and immunochemical evidence. *Neurosci.* 57: 725–732.
- Morales-Lázaro S.L., Simon S.A., Rosenbaum T. (2013). The role of endogenous molecules in modulating pain through transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *J. Physiol.* 591: 3109-3121.
- Morenilla-Palao C., Pertusa M., Meseguer V., Cabedo H., Viana F. (2009). Lipid raft segregation modulates TRPM8 channel activity. *J. Biol. Chem.* 284: 9215–9224.
- Moskowitz M.A. (1992). Trigeminovascular system. *Cephalalgia.* 12: 127-128.
- Mulder H., Uddman R., Moller K., Zhang Y.Z., Ekblad E., Alumets J., Sundler F. (1994). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide expression in sensory neurons. *Neurosci.* 63: 307-312.
- Murck H., Steiger A., Frieboes R.M., Antonijevic I.A. (2007). Pituitary adenylate cyclase activating peptide affects homeostatic sleep regulation in healthy young men. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292: 853-857.
- Nagata K., Duggan A., Kumar G., Garcia-Anoveros J. (2005). Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J. Neurosci.* 25: 4052–4061.
- Nagy L., Filotas D., Boros M., Pozsgai G., Pintér E., Nagy G. (2014). Amperometric cell for subcutaneous detection of hydrogen sulfide in anesthetized experimental animals. *Physiol. Meas.* 35: 2475-2487.
- Nagy P. (2015). Mechanistic chemical perspective of hydrogen sulfide signaling. *Methods. Enzymol.* 554: 3-29.

- Nakajima E., Walkup R.D., Fujii A., Shearer T.R., Azuma M. (2013). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide induces neurite outgrowth in cultured monkey trigeminal ganglion cells: involvement of receptor PAC1. *Mol. Vis.* 19: 174-183.
- Naylor J., Li J., Milligan C.J., Zeng F., Sukumar P., Hou B., Sedo A., Yuldasheva N., Majeed Y., Beri D., Jiang S., Seymour V.A., McKeown L., Kumar B., Harteneck C., O'Regan D., Wheatcroft S.B., Kearney M.T., Jones C., Porter K.E., Beech D.J. (2010). Pregnenolone sulphate- and cholesterol-regulated TRPM3 channels coupled to vascular smooth muscle secretion and contraction. *Circ. Res.* 106: 1507–1515.
- Nelson E.K. (1919). The constitution of capsaicin, the pungent principle of capsicum. *J. Am. Chem. Soc.* 41: 1115-1117.
- Németh J., Helyes Zs., Görcs T., Gardi J., Pintér E., Szolcsányi J. (1996). Development of somatostatin radioimmunoassay for the measurement of plasma and tissue contents of hormone. *Acta Physiol. Hung.* 84: 313-315.
- Németh J., Görcs T., Helyes Zs., Oroszi G., Kocsy T., Pintér E., Szolcsányi J. (1998). Development of a new sensitive CGRP radioimmunoassay for neuropharmacological research. *Neurobiology.* 6: 473-475.
- Németh J., Reglodi D., Pozsgai G., Szabó A., Elekes K., Pintér E., Szolcsányi J., Helyes Z. (2006). Effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 on sensory neuropeptide release and neurogenic inflammation in rats and mice. *Neurosci.* 143: 223-230.
- Nicole P., Lins L., Rouyer-Fessard C., Drouot C., Fulcrand P., Thomas A., Couvineau A., Martinez J., Brasseur R., Laburthe M. (2000). Identification of key residues for interaction of vasoactive intestinal peptide with human VPAC1 and VPAC2 receptors and development of a highly selective VPAC1 receptor agonist. Alanine scanning and molecular modeling of the peptide. *J. Biol. Chem.* 275: 24003-24012.
- Nicolson G.L., Singer S.J. (1972). Electron microscopic localization of macromolecules on membrane surfaces. *Ann. N Y Acad. Sci.* 195: 368-375.
- Nielsen K.M., Chaverra M., Hapner S.J., Nelson B.R., Todd V., Zigmond R.E., Lefcort F. (2004). PACAP promotes sensory neuron differentiation: Blockade by neurotrophic factors. *Mol. Cell. Neurosci.* 25: 629–641.
- Nieto Posadas A., Jara-Osequera A., Rosenbaum T. (2011). TRP channel gating physiology. *Curr. Top. Med. Chem.* 11: 2131-2150.
- Nilius B. (2007). Transient receptor potential (TRP) cation channels: rewarding unique proteins. *Bull. Mem. Acad. R. Med. Belg.* 162: 244-253.
- Nozawa K., Kawabata-Shoda E., Doihara H., Kojima R., Okada H., Mochizuki S., Sano Y., Inamura K., Matsushime H., Koizumi T., Yokoyama T., Ito H. (2009). TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106: 3408–3413.
- Numazaki M., Tominaga T., Takeuchi K., Murayama N., Toyooka H., Tominaga M. (2003). Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100 : 8002–8006.
- Oberwinkler J., Philipp S.E. (2014). TRPM3. *Handb. Exp. Pharmacol.* 222: 427–459.
- Oh D.S., Lieu S.N., Yamaguchi D.J., Tachiki K., Lambrecht N., Ohning G.V., Sachs G., Germano P.M., Pisegna J.R. (2005). PACAP regulation of secretion and proliferation of pure populations of gastric ECL cells. *J. Mol. Neurosci.* 26: 85-98.
- Ostrom R.S., Insel P.A. (2004). The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signaling: implications for molecular pharmacology. *British Journal of Pharmacology.* 143: 235-245.
- Pantaloni C., Brabet P., Bilanges B., Dumuis A., Houssami S., Spengler D., Bockaert J., Journot L. (1996). Alternative splicing in the N-terminal extracellular domain of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) receptor modulates receptor selectivity and relative potencies of PACAP-27 and PACAP-38 in phospholipase C activation. *J. Biol. Chem.* 271: 22146–22151.

- Papakosta M., Dalle C., Haythornthwaite A., Cao L., Stevens E.B., Burgess G., Russell R., Cox P.J., Phillips S.C., Grimm C. (2011). The chimeric approach reveals that differences in the TRPV1 pore domain determine species-specific sensitivity to block of heat activation. *J. Biol. Chem.* 286: 39663-39672.
- Parton R.G., Richards A.A. (2003). Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insight and common mechanisms. *Traffic*. 4: 724-738.
- Pataki I., Adamik A., Jászberényi M., Mácsai M., Telegdy G. (2000). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces hyperthermia in the rat. *Neuropharmacology*. 39: 1303-1308.
- Pedersen S.F., Owsianik G., Nilius B. (2005). TRP channels: An overview. *Cell Calcium*. 38: 233-252.
- Peier A.M., Moqrich A., Hergarden A.C., Reeve A.J., Andersson D.A., Story G.M., Earley T.J., Dragoni I., McIntyre P., Bevan S., Patapoutian A. (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*. 108: 705-715.
- Pozsgai G., Hajna Z., Bagoly T., Boros M., Kemény Á., Materazzi S., Nassini R., Helyes Z., Szolcsányi J., Pintér E. (2012). The role of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor activation in hydrogen-sulphide-induced CGRP-release and vasodilation. *Eur. J. Pharmacol.* 689: 56-64.
- Predmore B.L., Kondo K., Bhushan S., Zlatopolsky M.A., King A.L., Aragon J.P., Grinsfelder D.B., Condit M.E., Lefer D.J. (2012). The polysulfide diallyl trisulfide protects the ischemic myocardium by preservation of endogenous hydrogen sulfide and increasing nitric oxide bioavailability. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 302: 2410-2418.
- Premkumar L.S., Ahern G.P. (2000). Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature*. 408: 985-990.
- Premkumar L.S., Raisinghani M., Pingle S.C., Long C., Pimentel F. (2005). Downregulation of transient receptor potential melastatin 8 by protein kinase C-mediated dephosphorylation. *J. Neurosci.* 25: 113322-113329.
- Prescott E.D., Julius D. (2003). A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science*. 300: 1284-1288.
- Qiao W., Chaoshu T., Hongfang J., Junbao D. (2010). Endogenous hydrogen sulfide is involved in the pathogenesis of atherosclerosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396: 182-186.
- Qu K., Lee S., Bian J., Low C.M., Wong P.H. (2008). Hydrogen sulfide: neurochemistry and neurobiology. *Neurochem. Int.* 52: 155-165.
- Reglődi D., Börzsei R., Bagoly T., Boronkai Á., Rác B., Tamás A., Kiss P., Horváth G., Brubel R., Németh J., Tóth G., Helyes Zs. (2008). Agonistic behavior of PACAP6-38 on sensory nerve terminals and cytotrophoblast cells. *J. Mol. Neurosci.* 36: 270-278.
- Reid G., Flonta M.L. (2002) Ion channels activated by cold and menthol in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci. Lett.* 324: 164-168.
- Rietveld A., Simons K. (1998). The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochim. Biophys. Acta.* 1376: 467-479.
- Robberecht P., Gourlet P., De Neef P., Woussen-Colle M.C., Vandermeers-Piret M.C., Vandermeers A., Christophe J. (1992). Structural requirements for the occupancy of pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) receptors and adenylate cyclase activation in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. Discovery of PACAP(6-38) as a potent antagonist. *Eur. J. Biochem.* 207: 239-246.
- Rozenfeld R., Devi L.A. (2011). Exploring a role for heteromerization in GPCR signalling specificity. *Biochem. J.* 433: 11-18.

- Samuel B.U., Mohandas N., Harrison T., McManus H., Rosse W., Reid M., Haldar K. (2001). The role of cholesterol and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins of erythrocyte rafts in regulating raft protein content and malarial infection. *J. Biol. Chem.* 276: 29319-29329.
- Sándor Z., Varga A., Horváth P., Nagy B., Szolcsányi J. (2005). Construction of a stable cell line uniformly expressing the rat TRPV1 receptor. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 10: 499-514.
- Schuelert N., McDougall J.J. (2006). Electrophysiological evidence that the vasoactive intestinal peptide receptor antagonist VIP6-28 reduces nociception in an animal model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 14: 1155-1162.
- Schytz H.W., Birk S., Wienecke T., Kruuse C. Olesen J., Ashina M. (2009). PACAP38 induces migraine-like attacks in patients with migraine without aura. *Brain.* 132: 16-25.
- Schytz H.W., Olesen J., Ashina M. (2010). The PACAP receptor: a novel target for migraine treatment. *Neurotherapeutics.* 7: 191-196.
- Shibuya N., Koike S., Tanaka M., Ishigami-Yuasa M., Kimura Y., Ogasawara Y., Fukui K., Nagahara N., Kimura H. (2013). A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. *Nat. Commun.* 4: 1366.
- Shintani N., Suetake S., Hashimoto H., Koga K., Kasai A., Kawaguchi C., Morita Y., Hirose M., Sakai Y., Tomimoto S., Matsuda T., Baba A. (2005). Neuroprotective action of endogenous PACAP in cultured rat cortical neurons. *Regulatory Peptides.* 126: 123-128.
- Simons K., Ikonen E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 387: 569-572.
- Story G.M., Peier A.M., Reeve A.J., Eid S.R., Mosbacher J., Hricik T.R., Earley T.J., Hergarden A.C., Andersson D.A., Hwang S.W., McIntyre P., Jegla T., Bevan S., Patapoutian A. (2003). ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell.* 112: 819-829.
- Spath E., Darling S.F. (1930). Synthesis of capsaicin. *Ber. Chem. Ges.* 65: 737-740.
- Streng T., Axelsson H.E., Hedlund P., Andersson D.A., Jordt S.E., Bevan S., Andersson K.E., Högestätt E.D., Zygmunt P.M. (2008). Distribution and function of the hydrogen sulfide-sensitive TRPA1 ion channel in rat urinary bladder. *Eur. Urol.* 53: 391-399.
- Szállási A., Blumberg P.M. (1990). Specific binding of resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog, by dorsal root ganglion membranes. *Brain. Res.* 524: 106-111.
- Szállási A., Blumberg P.M. (1999). Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.* 51: 159-212.
- Szőke É., Balla Zs, Csernoch L., Czéh G., Szolcsányi J. (2000). Interacting effects of capsaicin and anandamide on intracellular calcium in sensory neurons. *Neuroreport.* 11: 1949-1952.
- Szőke É., Börzsei R., Tóth D.M., Lengl O., Helyes Z., Sándor Z., Szolcsányi J. (2010). Effect of lipid raft disruption on TRPV1 receptor activation of trigeminal sensory neurons and transfected cell line. *Eur. J. Pharmacol.* 628: 67-74.
- Szolcsányi J. (1984a). Capsaicin and neurogenic inflammation: history and early findings. In: Chahl L.A., Szolcsányi J., Lembeck F. (Eds.) *Antidromic Vasodilatation and Neurogenic Inflammation.* Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 7-26.
- Szolcsányi J. (1984b). Capsaicin-sensitive chemoceptive neural system with dual sensory-efferent function. In: Chahl L.A., Szolcsányi J., Lembeck F. (Eds.) *Antidromic Vasodilatation and Neurogenic Inflammation.* Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 27-53.
- Szolcsányi J., Jancsó-Gábor A. (1975). Sensory effects of capsaicin congeners I. Relationship between chemical structure and pain-producing potency of pungent agents. *Arzneimittelforschung.* 25: 1877-1881.

- Szolcsányi J., Jancsó-Gábor A., Joó F. (1975). Functional and fine structural characteristics of the sensory neuron blocking effect of capsaicin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 287: 157-169.
- Szolcsányi J., Jancsó-Gábor A. (1976). Sensory effects of capsaicin congeners II: Importance of chemical structure and pungency in desensitizing activity of capsaicin-type compounds. *Arzneimittelforschung.* 26: 33-37.
- Szolcsányi J. (1996). Neurogenic inflammation: reevaluation of axon reflex theory. In: Gepetti P., Holzer P. (Eds.) *Neurogenic Inflammation.* CRC Press, Boca Raton, pp. 33-42.
- Szolcsányi J., Helyes Zs., Oroszi G., Németh J., Pintér E. (1998). Release of somatostatin and its role in the mediation of the anti-inflammatory effect induced by antidromic stimulation of sensory fibres of rat sciatic nerve. *Br. J. Pharmacol.* 123: 936-942.
- Szolcsányi J. (2004). Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptides.* 38: 377-384.
- Szolcsányi J., Sándor Z. (2012). Multimeric TRPV1 nociceptor: a target for analgesics. *Trends Pharmacol. Sci.* 33: 646-655.
- Takahashi N., Mizuno Y., Kozai D., Yamamoto S., Kiyonaka S., Shibata T., Uchida K., Mori Y. (2008). Molecular characterization of TRPA1 channel activation by cysteine-reactive inflammatory mediators. *Channels.* 2: 287-298.
- Tabas I., Zha X., Beatini N., Myers J.N., Maxfield F.R. (1994). The actin cytoskeleton is important for the stimulation of cholesterol esterification by atherogenic lipoproteins in macrophages. *J. Biol. Chem.* 269: 22547-22556.
- Tajti J., Uddman R., Möller S., Sundler F., Edvinsson L. (1999). Messenger molecules and receptor mRNA in the human trigeminal ganglion. *J. Auton. Nerv. Syst.* 76: 176-183.
- Tajti J., Uddman R., Edvinsson L. (2001). Neuropeptide localization in the "migraine generator" region of the human brainstem. *Cephalalgia.* 21: 96-101.
- Taylor-Clark T.E., McAlexander M.A., Nassenstein C., Sheardown S.A., Wilson S., Thornton J., Carr M.J., Undem B.J. (2008). Relative contributions of TRPA1 and TRPV1 channels in the activation of vagal bronchopulmonary C-fibres by the endogenous autacoid 4-oxononanal. *J. Physiol.* 586: 3447-3459.
- Thastrup O., Cullen P.J., Drøbak B.K., Hanley M.R., Dawson A.P. (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 2466-2470.
- Theoharides T.C., Donelan J., Kandere-Grzybowska K., Konstantinidou A. (2005). The role of mast cells in migraine pathophysiology. *Brain. Res. Rev.* 49: 65-76.
- Thresh L.T. (1846). Isolation of capsaicin. *Pharm. J.* 6: 941-947.
- Tominaga M., Caterina M.J., Malmberg A.B., Rosen T.A., Gilbert H., Skinner K., Raumann B.E., Basbaum A.I., Julius D. (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron.* 21: 531-543.
- Tsutsumi M., Claus T.H., Liang Y., Li Y., Yang L., Zhu J., Dela Cruz F., Peng X., Chen H., Yung S.L., Hamren S., Livingston J.N., Pan C.Q. (2002). A potent and highly selective VPAC2 agonist enhances glucose-induced insulin release and glucose disposal: a potential therapy for type 2 diabetes. *Diabetes.* 51: 1453-1460.
- Tuka B., Helyes Z., Markovics A., Bagoly T., Szolcsányi J., Szabó N., Tóth E., Kincses Z.T., Vécsei L., Tajti J. (2013). Alterations in PACAP-38-like immunoreactivity in the plasma during ictal and interictal periods of migraine patients. *Cephalalgia.* 33: 1085-1095.

- Uchida D., Tatsuno I., Tanaka T., Hirai A., Saito Y., Moro O., Tajima M. (1998). Maxadilan is a specific agonist and its deleted peptide (M65) is a specific antagonist for PACAP type 1 receptor. *Ann. N Y Acad. Sci.* 865: 253-258.
- Uddman R., Tajti J., Hou M., Sundler F., Edvinsson L. (2002). Neuropeptide expression in the human trigeminal nucleus caudalis and in the cervical spinal cord C1 and C2. *Cephalalgia.* 22: 112-116.
- Vandermeers A., Vandenborre S., Hou X. de Neef P., Robberecht P., Vandermeers-Piret M.C., Christophe J. (1992). Antagonistic properties are shifted back to agonistic properties by further N-terminal shortening of pituitary adenylate-cyclase activating peptides in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. *Eur. J. Biochem.* 208: 815-819.
- Vaudry D., Gonzalez B.J., Basille M., Anouar Y., Fournier A., Vaudry H. (1998). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide stimulates both c-fos gene expression and cell survival in rat cerebellar granule neurons through activation of the protein kinase A pathway. *Neuroscience.* 84: 801-812.
- Vaudry D., Gonzalez B.J., Basille M., Yon L., Fournier A., Vaudry H. (2000). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol. Rev.* 52: 269-324.
- Vaudry D., Falluel-Morel A., Bourgault S., Basille M., Burel D., Wurtz O., Beauvillain J.C., Gonzalez B.J. (2009). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol. Rev.* 61: 283-357.
- Vellani V., Mapplebeck S., Moriondo A., Davis J.B., McNaughton P.A. (2001). Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *The Journal of Physiology.* 534: 813-825.
- Villalón C.M., Centurión D., Valdivia L.F., de Vries P., Saxena P.R. (2003). Migraine: pathophysiology, pharmacology, treatment and future trends. 1: 71-84.
- Vígh S., Arimura A., Gottschall P.E., Kitada C., Somogyvári-Vigh A., Childs G.V., Grimm C., Kraft R., Schultz G., Harteneck C. (2005). Cytochemical characterization of anterior pituitary target cells for the neuropeptide, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP), using biotinylated ligands. *Peptides.* 14: 59-65.
- Vriens J., Owsianik G., Hofmann T., Philipp S.E., Stab J., Chen X., Benoit M., Xue F., Janssens A., Kerselaers S., Oberwinkler J., Vennekens R., Gudermann T., Nilius B., Voets T. (2011). TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. *Neuron.* 70: 482-494.
- Vriens J., Held K., Janssens A., Tóth B.I., Kerselaers S., Nilius B., Vennekens R., Voets T. (2014). Opening of an alternative ion permeation pathway in a nociceptor TRP channel, *Nat. Chem. Biol.* 10: 188-195.
- Wagner T.F., Loch S., Lambert S., Straub I., Mannebach S., Mathar I., Düfer M., Lis A., Flockerzi V., Philipp S.E., Oberwinkler J. (2008). Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic beta cells. *Nat. Cell. Biol.* 10: 1421-1430.
- Waheed A.A., Freed E.O. (2010). The Role of Lipids in Retrovirus Replication. *Viruses.* 2: 1146-1180.
- Walker C.S., Sundrum T., Hay D.L. (2014). PACAP receptor pharmacology and agonist bias: analysis in primary neurons and glia from the trigeminal ganglia and transfected cells. *Br. J. Pharmacol.* 171: 1521-1533.
- Wallace J.L., Vong L., McKnight W., Dicay M., Martin G.R. (2009). Endogenous and exogenous hydrogen sulfide promotes resolution of colitis in rats. *Gastroenterology.* 137: 569-578.
- Wallace J.L., Caliendo G., Santagada V., Cirino G. (2010). Markedly reduced toxicity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of naproxen (ATB-346). *Br. J. Pharmacol.* 159: 1236-1246.
- Wang S., Dai Y., Fukuoka T., Yamanaka H., Kobayashi K., Obata K., Cui X., Tominaga M., Noguchi K. (2008). Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. *Brain.* 131: 1241-1251.

- Wang M., Guo Z., Wang S. (2012) Cystathionine gamma-lyase expression is regulated by exogenous hydrogen peroxide in the mammalian cells. *Gene Expr.* 15: 235-241.
- Webster L.R., Malan T.P., Tuchman M.M., Mollen M.D., Tobias J.K., Vanhove G.F. (2010). A multicenter, randomized, double-blind, controlled dose finding study of NGX-4010, a high-concentration capsaicin patch, for the treatment of postherpetic neuralgia. *J. Pain.* 11: 972–982.
- Welch J.M., Simon S.A., Reinhart P.H. (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.
- White B.J., Smith P.A., Dunn W.R. (2013). Hydrogen sulphide-mediated vasodilatation involves the release of neurotransmitters from sensory nerves in pressurized mesenteric small arteries isolated from rats. *Br. J. Pharmacol.* 168: 785-793.
- Wood J.N., Winter J., James I.F., Rang H.P., Yeats J., Bevan S. (1988). Capsaicin- induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. *J. Neurosci.* 8: 3208-3220.
- Wood J.N., Walpole C., James I.F., Dray A., Coote P.R. (1990). Immunochemical detection of photoaffinity-labelled capsaicin- binding proteins from sensory neurons. *FEBS Lett.* 269: 381-385.
- Yada T., Vigh S., Arimura A. (1993). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) increases cytosolic-free calcium concentration in folliculo-stellate cells and somatotropes of rat pituitary. *Peptides.* 14: 235-239.
- Zanardo R.C.O., Brancaleone V., Distrutti E., Fiorucci S., Cirino G., Wallace J.L. (2006). Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 20: 2118–2120.
- Zhong G., Chen F., Cheng Y., Tang C., Du J. (2003). The role of hydrogen sulfide generation in the pathogenesis of hypertension in rats induced by inhibition of nitric oxide synthase. *J. Hypertens.* 21: 1879-1885.
- Zhu D., Xiong Wen C., Mei L. (2006). Lipid rafts serve as a signalling platform for nicotinic acetylcholine receptor clustering. *J. Neurosci.* 26: 4841-4851.
- Zygmunt P.M., Petersson J., Andersson D.A., Chuang H., Sjørgård M., Di Marzo V., Julius D., Högestätt E.D. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature.* 400: 452–457.

10. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

10.1 Az értekezés alapját képező publikációk

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

IF: 4,408

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

IF: 3,357

Hajna Zs., Sághy É., Payrits M., Aubdool A.A., Szőke É., Pozsgai G., Bátai I.Z., Nagy L., Filótás D., Helyes Zs., Brain S.D., Pintér E. *Capsaicin-sensitive sensory nerves mediate the cellular and microvascular effects of H_2S via TRPA1 receptor activation and neuropeptide release*.

Közlésre benyújtva.

Pozsgai G., Payrits M., Sághy É., Sebestyén-Báti R., Steen E., Szőke É., Solymár M., Garami A., Orvos P., Tálosi L., Helyes Zs., Pintér E. *Analgesic effect of dialkyl polysulfide compound dimethyl trisulfide in mice is mediated by TRPA1 and sst4 receptors*.

Közlésre benyújtva.

10.2 Egyéb eredeti publikációk

Payrits M., Sághy É., Mátyus P., Czompa A., Ludmerczki R., Deme R., Sándor Z., Helyes Zs., 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.

IF: 3,357

Pohóczky K., Kun J., Szalontai B., Szőke É., Sághy É., Payrits M., Kajtár B., Kovács K., Környei J.L., 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.

IF: 3,081

Szánti-Pintér E., Wouters J., Gömöry Á., Sághy É., Szőke É., Helyes Z., Kollár L., Skoda-Földes R. (2015). *Synthesis of novel 13 α -18-norandrostane-ferrocene conjugates via homogeneous catalytic methods and their investigation on TRPV1 Receptor Activation*. Steroids. 104: 284-293.

IF: 2,639

Sághy É., Sipos É., Ács P., Bölcskei K., Pohóczky K., Kemény Á., Sándor Z., Szőke É., Sétáló Gy. Jr., Komoly S., Pintér E. *TRPA1 deficiency is protective in cuprizone-induced demyelination – a new target against oligodendrocyte apoptosis*.

Közlésre benyújtva.

10.3 Idézhető absztraktok

Szőke É., **Sághy É.**, Bánki E., Kelemen M., Reglődi D., Tóth G., Couvineau A., Helyes Zs. (2013). *Differential actions of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide receptors on sensory neurons and cell lines*. Journal of Neurochemistry. 125: 163.

Sághy É., Szőke É., Bánki E., Reglődi D., Tóth G., Couvineau A., Helyes Zs. (2013). *Pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide and its analogues activate the specific PAC1 and VPAC1/VPAC2 receptors on the cell bodies of primary sensory neurons and transfected cell lines*. J. Mol. Neurosci. 51: 176- 233.

Sághy É., Szőke É., Bánki E., Kelemen M., Reglődi D., Tóth G., Couvineau A., Helyes Zs. (2013). *Effects of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide analogues on cell bodies of primary sensory neurons and transfected cell lines*. XIV. Conference of the Hungarian Neuroscience Society, Budapest, pp.121-123. (ISBN:978-963-88224-2-0).

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

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

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

Pintér E., **Sághy É.**, Bölcskei K., Ács P., Komoly S., Perkecz A., Gaszner B., Sipos É., Kemény Á., Szőke É., Sándor Z., Helyes Zs. (2015). *The role of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) receptors in the cuprizone-induced demyelination model*. Journal of Neurochemistry. 134: 288.

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

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

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

10.4 Kongresszusi poszter prezentációk

Szőke É., **Sághy É.**, Helyes Zs., Szolcsányi J. *Role of sphingomyelin and lipid raft in TRP ion channel activation*. PBPS Focused Meeting on Neuropeptides, London, Anglia, 2012.

Szőke É., **Sághy É.**, Helyes Zs., Szolcsányi J. *A szfingomielin és a lipid raftok szerepe a TRP ioncsatornák aktivációjában trigeminális érzőidegsejteken és sejtvonalon*. A Magyar Élettani Társaság, a Magyar Anatómusok Társasága, a Magyar Biofizikai Társaság és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság Kongresszusa, Debrecen, 2012.

Sághy É., Szőke É., Bánki E., Kelemen M., Reglődi D., Tóth G., Couvineau A., Helyes Zs. *Receptor activation by pituitary adenylate-cyclase activating polipeptide analogues on transfected cell lines and cell bodies of primary sensory neurons*. 10th Joint Meeting of the European Neuropeptide Club and the Summer Neuropeptide Conference, Gdansk, Lengyelország, 2013.

Szőke É., **Sághy É.**, Bagoly T., Helyes Zs., Szolcsányi J. *Effect of Resolvin D1 and Resolvin D2 on TRP ion channel activation*. 10th Joint Meeting of the European Neuropeptide Club and the Summer Neuropeptide Conference, Gdansk, Lengyelország, 2013.

Sághy É., Payrits M., Szőke É., Bagoly T., Mátyus P., Deme R., Helyes Zs. *Role of semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) inhibitors on TRP ion channel activation*. IBRO Workshop 2014, Debrecen, Magyarország, 2014.

Payrits M., Szőke É., **Sághy É.**, Bagoly T., Helyes Zs., Szolcsányi J. *Effect of resolvin D1 and resolvin D2 on TRP ion channel activation*. IBRO Workshop, Debrecen, Magyarország, 2014.

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

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

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

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

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

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

Szőke É., **Sághy É.**, Payrits M., Bánki E., Reglődi D., Tóth G., Couvineau A., Helyes Zs. *Effect of Pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide and its analogues on the specific PAC1 and VPAC1/VPAC2 receptors on the cell bodies of primary sensory neurons and transfected cell lines*. World Congress of Pharmacology, Cape Town, Dél-Afrika, 2014.

Sághy É., Payrits M., Szőke É., Pozsgai G., Pintér. E. *Activation of TRPA1 ion channel by hydrogen sulfide and polysulfides in trigeminal sensory neurons*. 20th International Symposium on Regulatory Peptides, Kyoto, Japán, 2014.

Szőke É., **Sághy É.**, Payrits M., Mátyus P., Deme R., Helyes Zs. *Dual antagonistic action of a semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) inhibitor on TRP ion channels on primary sensory neurons and sensory nerve terminals*. 20th International Symposium on Regulatory Peptides, Kyoto, Japán, 2014.

Pozsgai G., **Sághy É.**, Payrits M., Szőke É., Steen E., Helyes Zs., Pintér E. *A poliszulfid dimetil-triszulfid analgetikus hatását a TRPA1 receptor közvetíti*. Joint Meeting of the Federation of European Physiological Societies (FEPS) and Hungarian Physiological Society, Budapest, Magyarország, 2014.

Pozsgai G., **Sághy É.**, Payrits M., Szőke É., Steen E., Helyes Zs., Pintér E. *Analgesic effect of polysulfide compound dimethyl trisulfide is mediated via TRPA1 receptors*. Pharmacology 2015, London, Anglia, 2015.

Payrits M., **Sághy É.**, Mátyus P., Czompa A., Ludmerczki R., Deme R., Helyes Zs., Szőke É. *Egy új oxim vegyület antagonista hatásának jellemzése Tranziens Receptor Potenciál ioncsatornákon*. A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság Experimentális Farmakológiai szekciójának IX. szimpóziuma. Velence, Magyarország, 2015.

Szőke É., **Sághy É.**, Payrits M., Helyes Zs., Börzsei R., Szolcsányi J. *A Szfingomielináz alkalmazása Tranziens Receptor Potenciál ioncsatornák vizsgálatában*. A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság Experimentális Farmakológiai szekciójának IX. szimpóziuma, Velence, 2015.

Pohóczky K., Szalontai B., Bohonyi N., Kercksmár A., Szőke É., **Sághy É.**, Payrits M., Perkecz A., Garai J., Garami A., Kovács K., Környei J., Koppán M., Helyes Zs. *Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1 és Ankirin 1 (TRPV1 és TRPA1) ioncsatornák jelenléte és ösztrogénfüggő expresszió-növekedése patkány és emberi endometriumban*. A Magyar Kísérlete és Klinikai Farmakológiai Társaság Experimentális Farmakológiai szekciójának IX. szimpóziuma, Velence, Magyarország, 2015.

Pintér E., Zsófia H., Pozsgai G., **Sághy É.**, Payrits M., Szőke É., Helyes Zs., Szolcsányi J. *Characterization of transient receptor potential ankyrin1 (TRPA1) receptor-mediated cellular and microvascular changes induced by hydrogen sulphide*. Pharmacology, London, Anglia, 2015.

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

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

Sághy É., Payrits M., Szőke É., Pozsgai G., Pintér E. *Hidrogén-szulfid donor vegyületek és poliszulfidok tranziens receptor potenciál ankyrin 1 (TRPA1) receptor aktiváló hatása érzőneuronokon*. A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság Experimentális Farmakológiai szekciójának IX. szimpóziuma, Velence, Magyarország, 2015.

Sághy É., Bölcskei K., Perkecz A., Sándor Z., Kemény Á., Szőke É., Ács P., Sipos É., Gaszner B., Komoly S., Helyes Zs., Pintér Erika. *A Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1 (TRPA1) receptor szerepe cuprizon-indukált kísérletes demyelinizáció modellben*. A Magyar Élettani Társaság 79. Vándorgyűlése és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság Konferenciája, Szeged, Magyarország, 2015.

Sághy É., Bölcskei K., Péter Á., Komoly S., Sipos É., Szőke É., Perkecz A., Gaszner B., Kemény Á., Sándor Z., Helyes Zs., Pintér E. *Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) receptor has regulatory role in the cuprizone-induced demyelination in mice*. IBRO Workshop, Budapest, Magyarország, 2016.

10.5 Kongresszusi szóbeli előadások

Sághy É., Szőke É., Bánki E., Reglődi D., Tóth G., Couvineau A., Helyes Zs. *A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid analógok hatása az elsődleges érzőneuronok sejtesttjére és transzfektált sejtekre.* A Magyar Élettani, Farmakológiai és Mikrocirkulációs Társaságok 2013. évi közös Tudományos Kongresszusa, Budapest, Magyarország, 2013.

Sághy É., Payrits M., Szőke É., Pintér E., Pozsgai G. *A hidrogén-szulfid és a poliszulfidok hatása elsődleges érzőneuronok sejtesttjére és perifériás érzőideg-végződésekre* Idegtudományi Centrum PhD és TDK Konferencia, Pécs, 2014.

Sághy É., Szőke É., Bánki E., Reglődi D., Tóth G., Couvineau A., Helyes Zs. *A PAC1 receptor antagonist PACAP6-38 agonista hatásai primer érzőneuron sejteken.* III. Pécs-Oklahoma Symposium, Pécs, Magyarország, 2014.

Sághy É., Bölcskei K., Ács P., Komoly S., Perkecz A., Gaszner B., Sipos É., Kemény Á., Szőke É., Sándor Z., Helyes Zs., Pintér E. *Genetic deletion of the Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) receptor inhibits cuprizone-induced demyelination in mice.* Neuropeptides, Aberdeen, Skócia, 2015.

11.KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőm Dr. Szőke Éva szakmai irányítását és a rengeteg segítséget, hasznos tanácsot, amivel a kutatómunkám során támogatott. Köszönöm a Doktori Iskola vezetőjének Prof. Dr. Pintér Erikának a kutatómunkám során nyújtott támogatását és a magasszintű szakmai tanácsait. Ezúton szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Helyes Zsuzsannának, aki lelkesedésével, szakmai felkészültségével mutatott követendő példát. Köszönetemet szeretném kifejezni Szolcsányi János Professzor Úrnak aki példát mutatott a kutatói pálya iránti elhivatottságból és magasszintű szakmai tanácsaival hozzájárult a kísérletek eredményességéhez. Köszönöm Prof. Dr. Pethő Gábornak az oktatómunkám során nyújtott támogatását. Köszönetet szeretnék mondani Dr. Bölcskei Katának és Dr. Pozsgai Gábornak, akik szakmai tanácsaikkal segítették a munkámat. Köszönettel tartozom Prof. Dr. Reglődi Dórának és Dr. Bánki Eszternek, akik segítséget nyújtottak a kézirat megírása során. Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Sándor Zoltánnak a TRPV1 receptor-expresszálo sejtvonal létrehozásáért. Köszönöm Prof. Dr. Erostyák János és Jánosi Tibor Zoltán fluoreszcencia spektroszkópia vizsgálatok során nyújtott segítségét. Köszönettel tartozom kollaborátorainknak, Dr. Alain Couvineaunak, hogy rendelkezésünkre bocsátotta a PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptor-expresszálo sejtvonalakat, Dr. Tóth Gábornak, aki a PACAP agonisták, antagonisták szintézisét végezte, illetve Dr. Sétáló Györgynek a kísérletek folyamán nyújtott segítségét. Köszönöm Dr. Tálosi Lászlónak és Orvos Péternek a patch-clamp vizsgálatokban való közreműködését. Köszönöm Ph.D hallgató társaimnak, Pohóczky Krisztinának, Payrits Majának és dr. Csekő Katának, hogy mindig számíthattam a szakmai és baráti segítségükre, támogatásukra. Köszönöm a kísérletek során nyújtott nélkülözhetetlen segítséget Buzási Ádámné Annának, Disztl Cecíliának, Perkecz Anikónak, Bagoly Teréznek és Ömböli Gyulánénak, akik asszisztensi munkájukkal járultak hozzá a kísérleteink sikerességéhez. A PhD tanulmányaimhoz nyújtott támogatásért köszönettel tartozom a Richter Gedeon Talentum Alapítványnak. Továbbá köszönetemet szeretném kifejezni a Farmakológiai és Farmakoterápiai Inézet minden munkatársának. Szeretném megköszönni családom és párom támogatását.