

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

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI



dr. SÁGHY 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

1. 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 idegvégződések, fájdalomszignált közvetítenek a központi idegrendszerbe. A 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 kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződések hármas funkcióval rendelkeznek: afferens, lokális és szisztémás efferens működéseket közvetítenek. Számos betegség patomechanizmusában a neurogén gyulladás fontos szerepet játszik (migrén, asztma, gyulladásos bélbetegségek, reumatoid arthritisz), melyet a jelenleg rendelkezésre álló gyógyszeres terápia nem képes hatékonyan befolyásolni (Szolcsányi és mtsai., 1996). Mindezek alapján szükséges új hatásmechanizmussal rendelkező, elsősorban az érzőideg-végződéseken ható fájdalomcsillapítók, gyulladáscsökkentők fejlesztése. A H₂S képes aktiválni a kapszaicin-érzékeny peptiderg érzőideg-végződéset, ezáltal szerepe lehet gyulladás- és fájdalomfolyamatokban. 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 a lipid raftokban, melyek szerkezeti integritása hatással van a receptorok működésére. A migrén patomechanizmusának leginkább elfogadott elmélete a trigeminovaskuláris teória (Moskowitz, 1992). A trigeminovaskuláris aktiváció következtében vazoaktív neuropeptidok, mint a kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP), P-anyag (SP) és vazoaktív intesztinális polipeptid (VIP) szabadulnak fel a végződésből, melyek értágulatot, plazmaprotein extravazációt, hízósejt degranulációt okoznak, kialakítva a neurogén gyulladást. A PACAP a trigeminovaskuláris rendszerrel összefüggő régiókban expresszálódik (Tajti és mtsai., 2001). Migrénes rohamok alatt emelkedett PACAP plazmakoncentrációt detektáltak, valamint a PACAP infúzió migrénszerű fejfájást generál (Tuka és mtsai., 2013; Schytz és mtsai., 2009). Kutatócsoportunk PACAP génhányos egerek felhasználásával végzett komplex magatartási, funkcionális és morfológiai vizsgálatai bizonyítják, hogy a PACAP jelentős szerepet játszik a trigeminovaskuláris rendszer aktivációjában (Markovics és mtsai., 2012). Ezen megfigyelések alapján a PACAP receptorok új potenciális terápiás célpontok lehetnek migrénellenes gyógyszerfejlesztés folyamán.

2. BEVEZETÉS

2.1 A lipid raft diszruptió hatása a TRP receptorok aktiválhatóságára

2.1.1 A TRP receptorok

A Tranziens Receptor Potenciál (TRP) receptorok számos szövetben és sejttypusban expresszáló nem-szelektív kationcsatornák (Pedersen és mtsai., 2005). A szekvencia és szerkezeti homológia alapján 6 aloszaladot különböztetünk meg. A TRP receptorok számos strukturális hasonlóságot mutatnak, 6 transzmembrán domént tartalmaznak, az 5. és 6. domén közötti hurok hozza létre a csatorna pórusát. A TRP receptorok polimodálisak, fizikai (feszültség, hőmérséklet, mechanikai ingerek) és kémiai (endogén, exogén) ingerek széles skálája aktivációhoz vezet. (Nilius és Szállási 2014).

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

A **TRPV1 receptor** expresszálódik a szenzoros neuronokon, a hásó gyöki ganglionban és a vékonyan myelinizált A δ és C rostokon (Tominaga és mtsai., 1998). A kapszaicin mellett számos vanilloid struktúrájú vegyület (reziniferatoxin (RTX), piperin, zingeron, eugenol) képes aktiválni a receptort. Az endogén agonisták közé tartozik az anandamid, az N-arachidonoil-dopamin és az N-oleoildopamin (Zygmunt és mtsai., 1999, Chu és mtsai., 2003). A fájdalmas hőinger (> 43 °C) és az alacsony pH (< 6) is receptor aktivációt vált ki (Nilius, 2007). Gyulladáskeltő mediátorok, mint bradikinin, prosztaglandinok, tumor nekrozis faktor α (TNF α), idegi növekedési faktor szenzitizálják a receptort. A receptor aktivációja során Na⁺ és Ca²⁺ áramlik a sejtbe, mely folyamat akciós potenciál kialakulását, valamint a végződésben tárolt neuropeptidek exocitózist eredményezi.

TRPA1 receptor és a TRPV1 nagymértékben koexpresszálódik a peptiderg afferens A δ és C rostok egy részében, , szerkezetének jellegzetessége az N-terminálison lokalizálódó nagyszámú (14-18) ankirin ismétlődés (Story és mtsai., 2003). A TRPA1 receptort hideg inger (<17 °C), mechanikai ingerek, exogén és endogén ligandok is képesek aktiválni. Az exogén agonisták közé tartozik az AITC, a formaldehid, az allicin és a fahéjaldehid (Bandell és mtsai., 2004; McNamara és mtsai., 2007; Bautista és mtsai., 2005). Gyulladásos folyamatok, oxidatív stressz és szövetkárosodás során felszabaduló endogén mediátorok és endogén gáztranszmitterek (NO, H₂S) is aktiválják a receptort (Andersson és mtsai., 2008; 2012). Számos G-protein-kapcsolt receptor, mint a bradikinin receptor, a proteináz aktivált receptor 2 TRPA1 receptor szenzitizációt okoz (Bandell és mtsai., 2004; Dai és mtsai., 2007). A TRPA1 receptor hőmérséklettel való aktiválhatósága evolúciós különbséget mutat, gerinctelenekben melege érzékeny, rágcsálókban hideg-érzékeny, míg főemlősökben hőmérséklet inszenzitív (Chen, 2015).

TRPM8 receptort aktiválja a 26 °C alatti hőmérséklet, a mentol, az icilin és az eukaliptol (Peier és mtsai., 2002; Bautista és mtsai., 2007). Szerkezetére jellemző, hogy ellentétben a TRPV1 és TRPA1 receptorokkal, az N-terminális nem tartalmaz ankirin-ismétlődéseket. A PIP₂ kötődése a TRP doménhez receptor

szenzitizációt okoz. A foszfolipáz C, protein kináz A és protein kináz C a receptor aktiválhatóságát gátolja. (Premkumar és mtsai., 2005; Laing és Dhaka, 2016).

A **TRPM3 receptor** számos neuronális és nem neuronális szövetben expresszálódik. A receptor potens agonistája a neuroszteroid pregnenolon-szulfát (Wagner és mtsai., 2008). A szulfát-csoport jelenléte és sztereokémiai helyzete a TRPM3 receptor aktiváló hatás szempontjából kulcsfontosságú (Majeed és mtsai., 2010). Egyéb szteránvázis vegyületek is képesek aktiválni a receptort. A TRPM3 receptoron specifikus szteroid kötőhelyet valószínűsítünk és a plazmamembránon való átjutásában alternatív útvonalakat azonosítottak (Drews és mtsai., 2014; Grimm és mtsai., 2005). 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).

2.1.2 A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződés

Az érzőideg-végződés egy speciális típusát alkotják a kapszaicin-érzékeny peptiderg afferensek, melyek hármas funkcióval rendelkeznek; klasszikus afferens valamint lokális és szisztémás efferens működéseket közvetítenek. A klasszikus afferens működés során az aktivált érzőideg-végződés a központi idegrendszer felé közvetítenek idegaktivitást, melynek eredménye a nocicepció kialakulása. Emellett aktiváció hatására az érzőideg-végződésből gyulladáskeltő neuropeptidok is felszabadulnak (CGRP, SP), melyek neurogén gyulladást hoznak létre (Jancsó és mtsai., 1967). Ez az érzőideg-végződés lokális efferens funkciója (Szolcsányi, 1984 a; b). Kutatócsoportunk bizonyította, hogy az aktivált érzőideg-végződésből a gyulladáskeltő neuropeptideken kívül szomatosztatin is felszabadul, mely szisztémás gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatást fejt ki. Ez az érzőideg-végződés szisztémás efferens funkciója melyet szenzokrin működésként definiáltak (Szolcsányi, 2004).

2.1.3 A lipid raftok

A Singer és Nicolson-féle folyékony mozaik modell szerint a lipid kettősrétegben a plazma proteinek random módon helyezkednek el. Újabb elmélet szerint a plazmamembránban mikrodomének találhatóak, melyek struktúrája, lipid- és fehérje összetétele eltér a környezetétől. A legismertebb mikrodomének a lipid raftok. A lipid raftokat magas fokú folyadékfázisú rendezettség jellemzi, míg a non-raft régiók a rendezetlen fázist alkotják (Rietveld és Simons, 1998). A lipid raftok számos fizikai-kémiai tulajdonsága eltér a környező membránra jellemző paramétereiktől, sűrűségük alacsonyabb, telített lipidekben, koleszterinben, szfingolipidekben és proteinekben gazdagok, 4 °C-on Triton X-100 detergensben oldhatatlanok. A koleszterin a membrán extra- és intracelluláris oldalán hasonló arányban jelenik meg, mely a raftok szerkezetének kialakításában és funkciójában kulcsszerepet tölt be (Simons és Ikonen, 1997). Funkcionális szempontból a membrán raftoknak számos alapvető sejtfiziológiai folyamatban tulajdonítanak fontos szerepet; szabályozzák a membrántranszport folyamatokat, valamint elősegítik a jelátvitel szempontjából fontos molekuláris kölcsönhatások kialakulását (Parton és Richards, 2003). A TRP receptor család számos tagja képez jelátviteli komplexet a lipid raftokkal (Liu és mtsai., 2006). A lipid raft kutatás fontos momentuma a farmakológiai

alapkutatásoknak, mert alternatív utat jelent a receptormolekulák és ezen keresztül a jelátviteli utak befolyásolásában. Számos módszerrel tanulmányozhatjuk a lipid raftok szerepét a receptorműködésben. A metil- β -ciklodextrin (MCD) a plazmamembrán koleszterin tartalmát depletálja, mely a lipid tutajok szétesését okozza. A szfingomielináz a plazmamembrán szfingomielin tartalmát hidrolizálja, míg a myriocin a szfingolipidek felépülését gátolja (Kobayashi mtsai., 2006).

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

2.2.1 A hidrogén-szulfid és a poliszulfidok szintézise, metabolizmusa, élettani hatásai

A hidrogén-szulfid a harmadik ismert gázmediátor emlős szervezetben a szén-monoxid és a nitrogén-monoxid mellett, mely a sejten belüli jelátviteli folyamatokat vezérlő gáz természetű kismolekulák legfrissebben felfedezett tagja (Wang és mtsai., 2012). A H_2S szintézise L-ciszteinből történik, cisztationin- β -szintáz, cisztationin- γ -liáz, 3-merkaptopiruvát-szulfurtranszferáz és cisztein-aminotranszferáz enzimek által katalizált reakciók folyamán. Újabb kutatások bizonyítják, hogy a H_2S D-ciszteinből is keletkezhet 3-MST és D-aminosav-oxidáz hatására. A H_2S metabolizmusa a mitokondriumban elsősorban szulfid-kinon-reduktáz enzim által vezérelt. A poliszulfidok H_2S -ből képződnek oxigén jelenlétében (Kimura és mtsai., 2013). Gyulladásos folyamatokban a H_2S pro- és antiinflammatorikus hatásokat is közvetíthet, a gyulladás típusától és a H_2S koncentrációtól függően. Karragénnel kiváltott artritisz modellben a H_2S -donor vegyületek gátolták az ödéma kialakulását (Zanardo és mtsai., 2006). A poliszulfid vegyület, a diallil-triszulfid gátolta *colitis ulcerosa* gyulladásos folyamatait, mely a TNF α expresszió és a nukleáris faktor κB (NF κB) aktivitás csökkentésén keresztül valósult meg (Bai és mtsai., 2005).

2.2.2 A hidrogén-szulfid és a poliszulfidok molekuláris célpontjai

A H_2S szignalizációs útvonalai, hatásmechanizmusa nem teljesen tisztázott, azonban számos molekuláris célpontot azonosítottak. A vazodilatátor hatásért K^+ ATP csatornák megnyílása tehető felelőssé. A H_2S nociceptív hatásának hátterében a T-típusú feszültségfüggő kalcium csatornák indirekt aktivációja állhat. Számos kísérleti elrendezésben bizonyították a H_2S és a poliszulfidok TRPA1 receptor aktiváló hatását. TRPA1 receptor-expresszálo kínai hörcsög ovárium (CHO) sejteken végzett *in vitro* kísérletben Ca^{2+} szignált detektáltak H_2S hatására (Streng és mtsai., 2008). Kutatócsoportunk eredményei alapján a H_2S értágító hatását TRPA1 receptor aktivációt követő perifériás érzőideg-végződésből felszabaduló CGRP okozza. (Pozsgai és mtsai., 2012). A szerves poliszulfid vegyületek TRPA1 receptor aktivációt okoznak asztrocitákon és szenzoros neuronokon (Kimura és mtsai., 2013; Hatakeyama és mtsai., 2015). A H_2S gyulladásos folyamatokra kifejtett hatása kapcsolatban áll az NF κB útvonallal (Chattopadhyay és mtsai., 2012).

2.3 A PACAP receptor agonisták és antagonisták hatásának vizsgálata

2.3.1 A PACAP előfordulása szervezetben és élettani hatásai

A *hypophys* adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) izolálása 1989-ben történt birka *hypothalamus*-ból, *hypophys*-ben kifejtett adenilát-cikláz stimuláló képessége alapján. A PACAP a szekretin-glukagon-VIP

peptidcsalád tagja (Miyata és mtsai., 1989). 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 *hippocampus*-ban, a *thalamus*-ban, a *hypophysis*-ben (Vaudry és mtsai., 2000). A PACAP jelenlétét kimutatták a fájdalomközvetítő pályarendszerben: a gerincvelő hátsó szarvában, DRG-ben és TRG-ben és a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok perifériás végződéseiben (Moller és mtsai., 1993; Fahrenkrug és Hannibal, 1998). A PACAP szerteágazó élettani hatásokkal rendelkezik. Az idegrendszeri differenciálódásban is kulcsfontosságú, emellett neuroprotektív hatással rendelkezik. Potens vazo- és bronchodilatátor, szabályozza a neurotranszmitterek felszabadulását, befolyásolja a gasztrointesztinális motilitást és szekréción (Vaudry és mtsai., 2000). A PACAP fontos szerepet tölt be a fájdalomérzés központi és perifériás szabályozásában a cirkadián ritmus- és hőszabályozásban (Davis-Taber és mtsai., 2008; Helyes és mtsai., 2007; Hannibal, 2006).

2.3.2 A PACAP receptorok és ligandok

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). A PACAP receptorok számos splice variánsát identifikáltak, a legnagyobb számú változatot a PAC1 receptor esetében azonosították, melyek különböző jelátviteli útvonalakat generálhatnak. (Arimura, 1998). A PAC1 és VPAC receptorokon számos agonistát és antagonistát azonosítottak, melyek a PACAP receptorok vizsgálatára alkalmas farmakológiai eszközök. Humán *neuroblastoma* NB-OK-1 sejteken végzett vizsgálatokkal igazolták, a PACAP6-38 potens PAC1/VPAC2 receptor antagonistá hatását (Robberecht és mtsai., 1992). Ezzel szemben, az antagonistá 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 (Reglődi és mtsai., 2008). A 61 aminosavból álló potens értágító peptid a maxadilán PAC1 receptor szelektív agonista (Lerner és mtsai., 1991). A maxadilán 65 (M65) specifikus PAC1 receptor antagonistá. Az M65 szelektíven gátolta a [¹²⁵I]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 (Tsutsumi és mtsai., 2002).

2.3.3 A PACAP szerepe migrénben

A PACAP szerepét migrén patomechanizmusában napjainkban intenzíven kutatják, mivel expresszáldódik az emberi és állati agy trigeminális rendszerrel összefüggő számos területén, az agytörzs ún. „migrén-generátor” régiójában (Tajti és mtsai., 2001). A PACAP és receptorainak jelenlétét kimutatták TRG-n kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok perifériás végződésein és érsimaizomsejteken (Tajti és mtsai., 1999, 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). A PACAP fontos mediátor a trigeminovaszkuláris aktivációban, mely a migrén patomechanizmusában szerepet játszik (Schytz és mtsai., 2010).

3. 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 célkitűzései a következők voltak:

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

A TRP receptorok aktivációja szempontjából releváns régiókat azonosították, azonban kevés tudomásunk van arról, hogy a mikro környezet megváltoztatása milyen hatást gyakorol a TRP receptorok működésére. A dolgozatomban részletezett kutatásunk célja annak megállapítása volt, hogy a lipid raft diszruptió hogyan befolyásolja a termoszenzitív TRP receptorok kémiai úton kiváltott aktivációját TRG neuronokon, perifériás érzőideg-végződéseken és TRPV1 receptor-expresszáldó 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 fontos mediátor a trigeminovaszkuláris aktivációban, mely a migrén kialakulásában fontos szerepet játszik. Mivel a trigeminovaszkuláris 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.

4. KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

4.1 Primer sejttenyészet és sejtvonalak

4.1.1 Patkány és egér trigeminális ganglionsejt tenyészet

1-4 napos Wistar patkányok és CD1, TRPA1^{+/+}, TRPA1^{-/-} egerek trigeminális ganglionját steril foszfát puffer oldatban (PBS) kipreparáltuk (Szőke és mtsai., 2000). A 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 sejt kultúrákat 37 °C-on 5% CO₂ jelenlétében tartottuk.

4.1.2 TRPV1, TRPA1 és PACAP receptor-expresszáló sejtvonalak

Vizsgálataink során patkány TRPV1, humán TRPA1, PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptort stabilan expresszáló CHO sejt vonalakat is használtunk (Sándor és mtsai., 2005; Gaudin és mtsai., 1996; Nicole és mtsai., 2000; Bourgault és mtsai., 2008).

4.2 Vizsgálati módszerek

4.2.1 Intracelluláris Ca²⁺ koncentráció mérés fluoreszcens módszerrel

A sejttenyészeteket fura-2 acetoxi-metilészter (fura-2 AM) (1 µM) fluoreszcens kalcium indikátor festékkel inkubáltuk (30 perc, 37 °C). A kísérleteket Olympus BX50WI fluoreszcens mikroszkóppal végeztük extracelluláris oldatban. A fluoreszcens képet egy vízimmerziós objektív és egy számítógéphez csatlakoztatott digitális kamera segítségével rögzítettük. A sejtek által felvett fluoreszcens festék 340 és 380 nm hullámhosszú fényvel való alternáló gerjesztését monokromátor biztosította, az emittált fényt 510 nm-en detektáltuk. A két hullámhosszon gerjesztett fluoreszcencia intenzitás arányát, az ún. racionális értéket (R=F340/F380) az idő függvényében Axon Imaging Workbench 2.2 szoftverrel generáltuk. Az eredmények értékelését Microcal Origin 7.0 szoftverrel végeztük.

4.2.2 Radioaktív ⁴⁵Ca²⁺ felvétel vizsgálatok

A sejteket 15 µl DMEM tápoldatot tartalmazó 72-lyukú mini tenyésztőedénybe helyeztük. Másnap a sejteket 10 µl Ca²⁺ mentes Hank's oldatban oldott tesztoldat és 200 µCi/ml ⁴⁵Ca²⁺ izotóp (1,3 Ci/mM) elegyében inkubáltuk. ECS oldattal történő mosást után a sejteket tartalmazó tenyésztőedényt 75 °C-ra helyeztük, majd 15 µl 0,1%-os nátrium-dodecil-szulfáttal lizáltuk a sejteket. A lizátum radioaktivitását 2 ml szcintillációs folyadékban Packard Tri-Carb 2800 TR számlálóval mértük. A ⁴⁵Ca²⁺ izotóp retenciót percenkénti beütésszám (CPM) értékben adtuk meg.

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

A PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptor-expresszáló CHO sejteket homogenizáltuk és 50 mM Tris-HCl pufferrel hígítottuk az optimális proteintartalom eléréséig. A membránfrakciókat Tris-EGTA pufferben

inkubáltuk, 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. A membránhoz kötött és nem kötött [³⁵S]GTPγS-t a minták Whatman GF/B filteren való vákuumszűrésével különítettük el. A filtereket 5 ml jéghideg Tris-HCl pufferrel mostuk, a membránfrakciókat tartalmazó filterdarabokat UltimaGold F szcintillációs folyadékba helyeztük, a radioaktivitást Packard Tri-Carb 2800 TR szcintillációs számlálóval mértük. A tesztanyagok által indukált G-protein aktivációt a ligandum hiányában megfigyelt specifikus [³⁵S]GTPγS kötődés százalékában adtuk meg.

4.2.4 Patch-clamp módszer

A patch-clamp méréseket TRPA1-transzfektált CHO sejtuszuspenzióan planár technikával végeztük, whole-cell konfigurációban négycsatornás Patchliner berendezéssel. 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. A pulzusfrekvencia 0,2 Hz volt. 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. 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.

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

A patkány *tracheákat* thiopentállal (50 mg/kg i.p.) történő altatás mellett kipreparáltuk. Az izolált légcsöveket 37 °C-on temperált, oxigenizált Krebs oldattal perfundáltuk. Az áramlás leállítását után 8 percenként lecserélve a kamrában lévő oldatokat prestimulációs, stimulációs és posztstimulációs fázisokat nyertünk. A második 8 perces szakaszban történt a *trachea* afferens idegvégződéseinek stimulációja kémiai úton. A szervfürdőkből vett 200 μl térfogatú mintákból RIA módszer segítségével határoztuk meg a CGRP koncentrációkat, melyet fmol/mg nedves szövetsúlyra vonatkoztatva fejeztünk ki (Németh és mtsai., 1998).

4.2.6 Fluoreszcencia spektroszkópia

A lipid raft diszruptió 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 végeztük. A spektrális változások számszerűsítésére általános polarizáció (GP) értékeket határoztunk meg, mind az emissziós mind a gerjesztési spektrumok esetében.

4.2.7 Filipin fluoreszcens jelölés

Az MCD által okozott koleszterin depléció nyomon követésére koleszterin-kötő fluoreszcens festéket alkalmaztunk a makrofágokon leírt protokoll szerint (Tabas és mtsai., 1994). CHO sejteket és TRG neuronokat 10 mM MCD-vel kezeltük (45 perc, 37 °C). A sejtenyészeteket PBS-sel mostuk, majd 4% formaldehiddel fixáltuk. 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 Olympus Fluoview-1000 rendszerrel analizáltuk.

4.3 Statisztikai analízis

Az adatokat átlag \pm SD, illetve \pm SEM értékekben adtuk meg, melyek legalább három független kísérlet eredményeiből származtak. A PACAP receptor agonisták és antagonisták vizsgálata esetén egyutas ANOVA, Bonferroni post hoc tesztet vagy kétmintás t-próbát, míg a lipid raft diszrupció 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} értékek meghatározására Graph Pad Prism 5.0 szoftvert, illetve SigmaPlot programot használtunk.

5. EREDMÉNYEK

5.1 A lipid raft diszrupció hatása a TRP receptorok aktiválhatóságára

5.1.1 Szfingomielináz kezelés hatása a TRP receptorok működésére TRG neuronokon

A szfingomielináz kezelés koncentrációfüggő módon csökkentette az AITC- és az icilin-érzékeny sejtek arányát. A kezelés azonban nem csökkentette szignifikánsan a pregnenolon-szulfátra reagáló sejtek arányát.

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

A szfingomielináz kezelés nem gátolta a sejtek KCl-érzékenységét, a racionális érték sem változott. A kezelésnek nem volt hatása a thapsigargin-szenzitív sejtek arányára.

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

Az előkezelések (1; 10 μ M ceramid/szfingozin, 37 °C, 60 perc) nem gátolták a kapszaicin által kiváltott $^{45}Ca^{2+}$ akkumulációt TRPV1 receptor-expresszáló CHO sejteken. Érzőneuronokon a kapszaicin és az AITC-szenzitív sejtek aránya nem változott szignifikáns mértékben a hidrolízis termékek hatására. A kapszaicin és AITC hatására detektált fluoreszcencia arány értékek ceramid-, illetve szfingozin-kezelést követően sem változtak.

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

A szfingomielináz kezelés koncentrációfüggő módon gátolta a kapszaicin-indukált CGRP exocitózist és csökkentette az AITC hatására felszabadult CGRP mennyiséget. Az icilin, a pregnenolon-szulfát és a

thapsigargin nem okozott RIA módszerrel detektálható CGRP felszabadulást. A ceramid és a szfingozin (10 μ M) nem befolyásolta a kapszaicin és az AITC által kiváltott CGRP excitációt.

5.1.5 MCD kezelés hatása a TRP receptorok működésére TRG neuronokon

A 10 mM MCD kezelés szignifikánsan csökkentette az AITC-szenzitív neuronok arányát és a raciometrikus értéket. Az icilinre reagáló kontroll sejtek aránya és a raciometrikus (R) érték szignifikánsan csökkent 1 mM MCD-vel történő inkubációt követően. A 3 mM MCD kezelés eltörölte a válaszokat. Az előkezelésnek nem volt hatása a TRPM3 receptor aktiválhatóságára.

5.1.6 Myriocin kezelés hatása a TRP receptorok működésére TRG neuronokon

A myriocin (200 nM) kezelés szignifikánsan csökkentette az AITC-, illetve az icilin-szenzitív neuronok arányát, valamint a fluoreszcencia arány emelkedést, azonban a pregnenolon-szulfátra reagáló sejtek arányára és az R értékre nem volt hatása.

5.1.7 MCD kezelés hatása a plazmamembrán rendezett és rendezetlen fázisainak arányára

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. A GP értékek ilyen irányú változásai egyértelmű bizonyítékot szolgáltatnak arra nézve, hogy a kezelés megváltoztatta a membrán rendezett és rendezetlen fázisainak arányát.

5.1.8 MCD kezelés koleszterin depletáló hatásának kimutatása

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

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

5.2.1 A hidrogén-szulfid donor vegyületek target molekulájának azonosítása TRG neuronokon

A H_2S donorok pontos koncentrációját a fluoreszcens $[Ca^{2+}]_i$ mérések alatt amperometriás H_2S szenzorral határoztuk meg. A gáztranszmitter hatására nagymértékű $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést detektáltunk TRPA1^{+/+} egér TRG neuronokon, mely 20-30 s latencia után fejlődött ki. A válaszok kinetikai jellemzői ionsatorna aktivációra utaltak. A detektált $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés reprodukálható volt, illetve az NaHS-szenzitív sejtek a szelektív TRPA1 agonista AITC-re is érzékenyek voltak. TRPA1^{-/-} egér TRG sejtenyészeten NaHS és Na₂S hatására sem detektáltunk $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést.

5.2.2 A DMTS target molekulájának azonosítása TRG neuronokon

A DMTS hatására gyorsan kifejlődő, ismételt Ca^{2+} választ detektáltunk TRPA^{+/+} egér TRG sejteken. TRPA^{-/-} egér érzőneuronokon a DMTS nem váltott ki hatást. A TRPA1 szelektív antagonistá vegyület a HC-030031 gátolta a DMTS-indukált $[Ca^{2+}]_i$ növekedést.

5.2.3 A DMTS hatása a TRPA1 áramokra TRPA1 receptor-expresszáló CHO sejteken

A DMTS 100 μM nagymértékű TRPA1 áramot váltott ki. A HC-030031 (30 μM) gátolta a DMTS (100 μM) által indukált TRPA1 áramot. A koncentráció-hatás görbe felvételéhez különböző koncentrációban alkalmaztuk a DMTS-t, pozitív kontrollként AITC szolgált. Az adatokat Hill egyenlettel illetve az EC_{50} értéket $18,46 \pm 0,31 \mu\text{M}$ -nak határoztuk meg.

5.3 A PACAP receptor agonisták és antagonisták hatásának vizsgálata

5.3.1 A PACAP receptor agonisták és antagonisták hatása TRG neuronokon

Wistar patkány TRG neuronokon lassan emelkedő $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t detektáltunk PACAP1-38 alkalmazásakor, mely kinetika a G-protein-kapcsolt receptor aktivációra jellemző. A PAC1/VPAC2 receptor antagonistá PACAP6-38 jelenlétében nem csökkent az agonistára reagáló a neuronpopuláció aránya, valamint az antagonistá önmagában is $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedést okozott a vizsgált neuronok jelentős részében. A TRG neuronok PACAP1-27-re, VIP-re, BAY 55-9837-re, maxadilánra is érzékenységet mutattak. Érdekes módon az antagonisták alkalmazásakor (VIP6-28, M65) is detektáltunk Ca^{2+} válaszokat. A VPAC1 receptor szelektív $\text{Ala}^{11,22,28}\text{VIP}$ -nek azonban nem volt számottevő hatása a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -re. Ca^{2+} mentes közegben is detektáltunk reagáló sejteket a PACAP analógok hatására. CD1 egér TRG neuronokon a patkány TRG sejteken maximális választ eredményező koncentrációban alkalmaztuk a peptideket. A vizsgált neuronok PACAP1-38-, VIP-, BAY 55-9837-érzékenységet mutattak. A patkány TRG neuronokon tapasztalt jelenséget figyeltük meg PACAP6-38 és M65 alkalmazásakor, fluoreszcencia arány növekedést detektáltunk az antagonisták hatására. A VPAC1 szelektív $\text{Ala}^{11,22,28}\text{VIP}$ -nek egér TRG neuronokon sem volt számottevő hatása.

5.3.2 A PACAP receptor agonisták és antagonisták hatása PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptor-expresszáló sejt vonalakon

PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptor-expresszáló CHO sejteken három különböző módszert alkalmaztunk: fluoreszcens $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mérést, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvétel vizsgálatokat és ^{35}S GTP γS kötődési tesztet.

A PAC1 receptor-expresszáló CHO sejtek PACAP1-38-ra és maxadilánra mutattak érzékenységet. Ellentétben a szenzoros neuronokon kapott eredményekkel, a PACAP6-38-nak és a M65 nem okozott szignifikáns mértékű $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedést. Az $\text{Ala}^{11,22,28}\text{VIP}$ és a BAY 55-9837 sem okozott receptor aktivációt. A PACAP1-38 és a maxadilán G-protein-kapcsolt receptor aktivációt okozott, míg a PACAP6-38, VIP6-28 és M65 nem váltott ki hatást.

A VPAC1 receptor-expresszáló CHO sejtek PACAP1-38-ra és $\text{Ala}^{11,22,28}\text{VIP}$ -re válaszoltak. A TRG neuronokkal ellentétben, a PACAP6-38, a maxadilán és az M65 sem váltott ki hatást. A VPAC2 receptor agonista BAY 55-9837 sem okozott receptor aktivációt. A PACAP1-38, a VIP és az $\text{Ala}^{11,22,28}\text{VIP}$ hatására G-protein-kapcsolt receptor aktivációt detektáltunk. míg a PACAP6-38, VIP6-28 és M65 nem váltott ki hatást.

A VPAC2 receptor-expresszáló CHO sejtek PACAP1-38-ra és BAY 55-9837-re mutattak érzékenységet. A PACAP6-38, a maxadilán, az M65, és az $\text{Ala}^{11,22,28}\text{VIP}$ sem váltott ki hatást. A PACAP1-38, a VIP és a

BAY 55-9837 ellentétben a PACAP6-38-cal, a VIP6-28-cal és az M65-tel G-protein-kapcsolt receptor aktivációt váltott ki.

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

Kapszaicin hatására szignifikánsan emelkedett CPM értéket határoztunk meg TRPV1 receptor-expresszálo CHO sejteken, ezzel szemben PACAP receptor-expresszálo sejtvonalakon a kapszaicin, a PACAP1-38 és a PACAP6-38 sem váltott ki hatást.

6. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

6.1 A lipid raft diszrupció hatása a TRP receptorok aktiválhatóságára

Kutatócsoportunk korábbi eredményei bizonyítják, hogy a lipid raft diszrupció egyaránt gátolta a TRPV1 receptor aktivációt TRG neuronokon és TRPV1-transzfektált sejteken (Szóke és mtsai., 2010). Bizonyítottuk, hogy a lipid raft károsodás szignifikánsan és koncentrációfüggő módon csökkentette a TRPA1 és a TRPM8 ioncsatorna nyitási valószínűségét, de nem volt hatással a TRPM3 receptor működésére. 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). Más munkacsoport az MCD kezelést követően csökkent TRPC1 receptor függő Ca^{2+} áramot detektált (Bergdahl és mtsai., 2003). 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. Kimutattuk, hogy a TRPM3 receptor működését érzőneuronokon a lipid raft diszrupció nem befolyásolta, melynek magyarázatául a receptor speciális szerkezeti jellemzői szolgálhatnak. A receptoron specifikus szteroid kötőhelyet karakterizáltak, valamint jelenleg ismeretlen járulékos fehérjékkel stabil komplexet képes kialakítani, mely formában rezisztens a lipid raft károsodásra (Drews és mtsai., 2014). 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 az AITC hatására kifejlődő Ca^{2+} tranzienseket és megnövelte a válaszok latenciaidejét. A szfingomielináz kezelés a reagáló érzőneuronok arányának redukálása mellett csökkentette az AITC hatására kifejlődő Ca^{2+} tranzienseket és megnövelte a válaszok latenciaidejét.

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. Bizonyítottuk, 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.

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

In vitro vizsgálattal igazoltuk, hogy a H₂S TRPA1 receptor aktivációján keresztül növeli a [Ca²⁺]_i-t TRG neuronokon. Az *in vitro* rendszerekben nyert adatok fontos kiindulópontjai az *in vivo* eredmények diszkussziójának. Az egérfülön topikálisan alkalmazott NaHS kezelés a mikroerek vazodilatációját okozta, véráramlás fokozódást idézett elő. Az RTX előkezelés, illetve a CGRP és NK₁ receptor antagonisták szignifikánsan csökkentette a H₂S donor vegyület hatására kialakuló mikrocirkuláció fokozódást. H₂S a TRPA1 receptoron keresztül a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződéseket aktiválja. A neurogén vazodilatációt az aktivált érzőideg-végződésből felszabaduló gyulladáskeltő neuropeptidek, mint a CGRP és az SP mediálják CGPR illetve NK₁ receptorokon keresztül. Mikrofluorimetriás és elektrofiziológiai vizsgálatok bizonyítják a DMTS TRPA1 aktiváló hatását *in vitro*. Kutatócsoportunk vizsgálta a DMTS hatását a hő-okozta mechanikai hiperalgécia modellben *in vivo*. DMTS a modellben a TRPA1^{+/+} és sst₄^{+/+} egereknél analgetikus hatást közvetített, ezzel szemben a TRPA1^{-/-} és sst₄^{-/-} csoportokban nem volt hatása a hő okozta mechanikai hiperalgécia mértékére. A DMTS antinocéptív hatásáért feltételezhetően az érzőideg-végződésekből TRPA1 aktivációt követően felszabaduló szomatosztatin sst₄ receptoron keresztül megvalósuló hatása felelős. Az *in vitro* eredményeink is ezt a megállapítást erősítik.

6.3 A PACAP receptor agonisták és antagonisták hatásának vizsgálata

TRG neuronokon PACAP1-38, PACAP1-27, VIP, maxadilan és BAY 55-9837 hatására lassan emelkedő [Ca²⁺]_i-t detektáltunk, mely kinetika az intracelluláris raktárakból történő Ca²⁺ kiáramlás jellemzője. Kísérleteinkben érdekes módon a számos modellben antagonistaként karakterizált PACAP6-38, M65 és VIP6-28 hatására érzőneuronokon Ca²⁺ válasz jött létre. A ligandok szelektivitását teszteltük PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptor-expresszálo CHO sejt vonalakon. A PACAP1-38 mindhárom PACAP receptor-expresszálo sejt vonalon megnövelte a [Ca²⁺]_i-t és G-protein-kapcsolt receptor aktivációt okozott, míg a szelektív agonisták receptor szelektivitásuknak megfelelően váltottak ki hatást. A Ca²⁺ hiányos közegben is detektálható Ca²⁺

válaszok bizonyítják, hogy a $[Ca^{2+}]_i$ növekedés hátterében specifikus mechanizmus, G-protein-kapcsolt receptor aktivációt követő intracelluláris raktárakból történő Ca^{2+} mobilizáció áll. 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. Egy újabb kutatási eredmény szerint a PACAP6-38 (1 μ M) gyenge parciális agonista Cos-7 sejteken (Walker és mtsai., 2014). A maxadilan fragmense az M65 PAC1 receptor specifikus antagonistája, 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 azonosított receptor létezését valószínűsítik a trigeminovaszkuláris 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 G-protein-kapcsolt receptorokon megvalósuló szignáltranszdukció komplexitásához hozzájárulnak a G-protein-kapcsolt receptorok között kialakuló interakciók. (Dautzenberg és mtsai., 1999; Holighaus és mtsai., 2011). 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). A VPAC1 receptor nem játszik szerepet a PACAP hatásának közvetítésében TRG sejteken, mivel a VPAC1 receptor szelektív agonista Ala^{11,22,28}VIP-nek nem volt hatása. 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. További vizsgálatok szükségesek a PACAP-indukált trigeminovaszkuláris aktiváció pontos mechanizmusának felderítése és új targetmolekulák azonosítása érdekében.

7. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Elsőként igazoltuk, hogy szenzoros neuronokon 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 sejttesteken, 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. 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 és TRPA1 receptor-expresszálo sejtvonalon. 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 hatást közvetítenek. Ezzel a megfigyeléssel ellentétben, PACAP receptor-expresszálo CHO sejteken nem mutatnak hasonló viselkedést. Bizonyítottuk, hogy szenzoros neuronokon a PACAP hatásának közvetítésében a PAC1 és VPAC2 receptorok játszanak szerepet. 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, szelektív PAC1 és VPAC2 antagonisták fejlesztésére, melyek fontos szerepet kaphatnak a migrénes fájdalom csillapításában.

8. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- Andersson D.A.** és mtsai. (2008). Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J. Neurosci.* 28: 2485–2494.
- Andersson D.A.** és mtsai. (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.
- Bai A.P.** és mtsai. (2005). Diallyl trisulfide inhibits tumor necrosis factor-alpha expression in inflamed mucosa of ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.* 50: 1426-1431.
- Bandell M.** és mtsai. (2004). Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron.* 41: 849–857.
- Bautista D.M.** és mtsai. (2005). Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 12248–12252.
- Bautista D.M.** és mtsai. (2007). The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature.* 448: 204–208.
- Bergdahl A.** és mtsai (2003). Cholesterol depletion impairs vascular reactivity to endothelin-1 by reducing store-operated Ca²⁺ entry dependent on TRPC1. *Circ. Res.* 93: 839–847.
- Bourgault S.** és mtsai. (2008). Novel stable PACAP analogs with potent activity towards the PAC1 receptor. *Peptides.* 29: 919-932.
- Chattopadhyay M.** és mtsai. (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.
- Chu C.J.** és mtsai. (2003). N-oleoyl-dopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. *J. Biol. Chem.* 278: 13633–13639.
- 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. .
- Dai Y.** és mtsai. (2007). Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. *J. Clin. Invest.* 117: 1979–1987.
- Dautzenberg F.M.** és mtsai. (1999). N-terminal splice variants of the type I PACAP receptor: isolation, characterization and ligand binding/selectivity determinants. *J. Neuroendocrinol.* 11: 941-949.
- Davis-Taber R.** és mtsai. (2008). Central pituitary adenylate cyclase 1 receptors modulate nociceptive behaviors in both inflammatory and neuropathic pain states. *J. Pain.* 9: 449-456.
- Drews A.** és mtsai. (2014). Structural requirements of steroidal agonists of transient receptor potential melastatin 3 (TRPM3) cation channels. *Br. J. Pharmacol.* 171: 1019–1032.
- 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.** és mtsai. (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.
- Grimm C.** és mtsai. (2005). Activation of the melastatin-related cation channel TRPM3 by d-erythro-sphingosine. *Mol. Pharmacol.* 67: 798–805.
- Hannibal J.** (2006). Roles of PACAP-containing retinal ganglion cells in circadian timing. *Int. Rev. Cytol.* 251: 1-39.
- Hatakeyama Y.** és mtsai. (2015). Polysulfide evokes acute pain through the activation of nociceptive TRPA1 in mouse sensory neurons. *Mol. Pain.* 11: 24.
- Helyes Zs.** és mtsai. (2007). Inhibitory effect of PACAP-38 on acute neurogenic and non-neurogenic inflammatory processes in the rat. *Peptides.* 28: 1847-1855.
- Holighaus I.** és mtsai. (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.
- Jancsó N.** és mtsai. (1967). Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br. J. Pharmacol.* 31: 138-151.
- Jansen-Olesen I.** és mtsai. (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.
- Kenakin T.** (2011). Functional selectivity and biased receptor signaling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 336: 296-302.
- Kimura Y.** és mtsai. (2013). Polysulfides are possible H₂S-derived signaling molecules in rat brain. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 27: 2451-2457.
- Kobayashi T.** és mtsai. (2006). Lipid rafts: new tools and a new component. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 1526–1531.
- Laburthe M.,** Couvineau A. (2002). Molecular pharmacology and structure of VPAC receptors for VIP and PACAP. *Regulatory Peptides.* 108: 165–173.

- Laing R.J.**, Dhaka A. (2016). ThermoTRPs and Pain. *Neuroscientist*. 22: 171-187.
- Lerner E.A** és mtsai. (1991). Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J. Biol. Chem.* 266: 11234–11236.
- Liu B.** és mtsai. (2003). Thermodynamics of heat activation of single capsaicin channels VR1, *Biophys. J.* 85: 2988–3006.
- Liu M.** és mtsai. (2006). TRPV1, but not P2x3, requires cholesterol for its function and membrane expression in rat nociceptors. *Eur. J. Neurosci.* 24: 1–6.
- Majeed Y.** és mtsai. (2010). Cis-isomerism and other chemical requirements of steroidal agonists and partial agonists acting at TRPM3 channels. *Br. J. Pharmacol.* 161: 430–441.
- Markovics A.** és mtsai. (2012). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide plays a key role in nitroglycerol-induced trigeminovascular activation in mice. *Neurobiol. Dis.* 45: 633-644.
- Markowitz S.** és mtsai. (1987). Neurogenically mediated leakage of plasma protein occurs from blood vessels in dura mater but not brain. *J. Neurosci.* 7: 4129-4136.
- McNamara C.R.** és mtsai. (2007). TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 13525–13530.
- Miyata A.** és mtsai. (1989). Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 567-574.
- Moller K.** és mtsai. (1993). Pituitary adenylate cyclase activating peptide is a sensory neuropeptide: Immunocytochemical and immunochemical evidence. *Neurosci.* 57: 725–732.
- Morenilla-Palao C.** és mtsai. (2009). Lipid raft segregation modulates TRPM8 channel activity. *J. Biol. Chem.* 284: 9215–9224.
- Moskowitz M.A.** (1992). Trigeminal system. *Cephalalgia*. 12: 127-128.
- Németh J.** és mtsai. (1998). Development of a new sensitive CGRP radioimmunoassay for neuropharmacological research. *Neurobiology*. 6: 473-475.
- Nicole P.** és mtsai. (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.
- Nilius B.** (2007). Transient receptor potential (TRP) cation channels: rewarding unique proteins. *Bull. Mem. Acad. R. Med. Belg.* 162: 244-253.
- Nilius B. és Szállási Á.** (2014). Transient receptor potential channels as drug targets: from science of basic research to the art of medicine. *Pharmacol. Rev.* 66: 676-814.
- Parton R.G.,** Richards A.A. (2003). Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insight and common mechanisms. *Traffic*. 4: 724-738.
- Pedersen S.F.** és mtsai. (2005). TRP channels: An overview. *Cell Calcium*. 38: 233-252.
- Peier A.M.** és mtsai. (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*. 108: 705–715.
- Pozsgai G.** és mtsai. (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.
- Premkumar L.S.** és mtsai. (2005). Downregulation of transient receptor potential melastatin 8 by protein kinase C-mediated dephosphorylation. *J. Neurosci.* 25: 113322-113329.
- Reglódi D.** és mtsai. (2008). Agonistic behavior of PACAP6-38 on sensory nerve terminals and cytotrophoblast cells. *J. Mol. Neurosci.* 36: 270-278.
- Rietveld A.** és 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.** és mtsai. (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.
- Sándor Z.** és mtsai. (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.** és mtsai. (2009). PACAP38 induces migraine-like attacks in patients with migraine without aura. *Brain*. 132: 16-25.
- Schytz H.W.** és mtsai. (2010). The PACAP receptor: a novel target for migraine treatment. *Neurotherapeutics*. 7: 191-196.
- Simons K.,** Ikonen E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 387: 569–572.
- Streng T.** és mtsai. (2008). Distribution and function of the hydrogen sulfide-sensitive TRPA1 ion channel in rat urinary bladder. *Eur. Urol.* 53: 391-399.
- Story G.M.** és mtsai. (2003). ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*. 112: 819–829.
- Szőke É.** és mtsai. (2000). Interacting effects of capsaicin and anandamide on intracellular calcium in sensory neurons. *Neuroreport*. 11: 1949–1952.
- Szőke É.** és mtsai. (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.** (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.** (2004). Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptides*. 38: 377-384.
- Tabas I.** és **mtsai.** (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.** és **mtsai.** (1999). Messenger molecules and receptor mRNA in the human trigeminal ganglion. *J. Auton. Nerv. Syst.* 76: 176-183.
- Tajti J.** és **mtsai.** (2001). Neuropeptide localization in the "migraine generator" region of the human brainstem. *Cephalalgia*. 21: 96-101.
- Tominaga M.** és **mtsai.** (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*. 21: 531-543.
- Tsutsumi M.** és **mtsai.** (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.** és **mtsai.** (2013). Alterations in PACAP-38-like immunoreactivity in the plasma during ictal and interictal periods of migraine patients. *Cephalalgia*. 33: 1085-1095.
- Uchida D.** és **mtsai.** (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.
- Vaudry D.** és **mtsai.** (2000). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol. Rev.* 52: 269-324.
- Vaudry D.** és **mtsai.** (2009). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol. Rev.* 61: 283-357.
- Vriens J.** és **mtsai.** (2011). TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. *Neuron*. 70: 482–494.
- Wagner T.F.** és **mtsai.** (2008). Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic beta cells. *Nat. Cell. Biol.* 10: 1421–1430.
- Walker C.S.** és **mtsai.** (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.
- Wang M.** és **mtsai.** (2012). Cystathionine gamma-lyase expression is regulated by exogenous hydrogen peroxide in the mammalian cells. *Gene Expr.* 15: 235-241.
- Zanardo R.C.O.** és **mtsai.** (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.
- Zygmunt P.M.** és **mtsai.** (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*. 400: 452–457.

9. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

9.1 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 Ca²⁺-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., Báta I.Z., Nagy L., Filotás D., Helyes Zs., Brain S.D., Pintér E. *Capsaicin-sensitive sensory nerves mediate the cellular and microvascular effects of H₂S via TRPA1 receptor activation and neuropeptide release.*
Közlésre benyújtva.

Pozsgai G., Payrits M., Sághy É., Sebestyén-Báta 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.

9.2 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 VI) 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.

Az értekezés alapját képező publikációk kumulatív impakt faktora: **7,765**

Az összes publikáció kumulatív impakt faktora: **16,842**

9.3 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.

Szöke 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., Szöke 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.

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

9.4 Kongressusi poszter prezentációk

Szöke 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.

Szöke 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., Szöke 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.

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

Sághy É., Payrits M., Szöke 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.**, Szöke 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., Szöke 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.

Szöke 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., Szöke 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.

Szöke 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., Szöke 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., Szöke 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., Szöke 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.

Szöke 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., Kerescsár A., Szöke 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 Ankyrin 1 (TRPV1 és TRPA1) ioncsatornák jelenléte és ösztrogénfüggő expresszió-növekedése patkány és emberi endometriumban.* A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság Experimentális Farmakológiai szekciójának IX. szimpóziuma, Velence, Magyarország, 2015.

Pintér E., Zsófia H., Pozsgai G., **Sághy É.**, Payrits M., Szöke 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.**, Szöke 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., Szöke 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., Szöke 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., Bölskei K., Perkecz A., Sándor Z., Kemény Á., Szöke 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., Bölskei K., Péter Á., Komoly S., Sipos É., Szöke 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.

9.5 Kongresszusi szóbeli előadások

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

Sághy É., Payrits M., Szöke É., Pintér E., Pozsgai G. *A hidrogén-szulfid és a poliszulfidok hatása elsődleges érzőneuronok sejttestjére 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 cuprizon-induced demyelination in mice.* Neuropeptides, Aberdeen, Skócia, 2015.

10. 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 segítettek 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 sejt vonal 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 sejt vonalakat, 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 Cecéliának, Perkecz Anikónak, Bagoly Teréznek és Öböli Gyulánának, 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 Intézet minden munkatársának. Szeretném megköszönni családom és párom támogatását.