

**TRANZIENS RECEPTOR POTENCIÁL ANKYRIN 1 ÉS VANILLOID 1  
IONCSATORNÁK, VALAMINT A HIPOFÍZIS ADENILÁT-CIKLÁZ AKTIVÁLÓ  
POLIPEPTID ELŐFORDULÁSA ÉS EXPRESSZIÓS VÁLTOZÁSAI  
ENDOMETRIUMBAN ÉS EMLŐBEN**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Pohóczky Krisztina**

Gyógyszertudományok Doktori Iskola – Neurofarmakológia Program

Programvezető: Prof. Dr. Pintér Erika

Témavezetők: Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna és Dr. Czeglédi Levente

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet



Pécs

2017.

## BEVEZETÉS

### 1. A Tranziens Receptor Potenciál (TRP) ioncsatornák

A TRP ioncsatornák nem szelektív kation csatornák, melyek a központi-és perifériás idegrendszer mellett számos nem-neurális szövetben és sejttypusban expresszálódnak. Sokféle exogén és endogén eredetű liganddal aktiválhatók, ligandfüggő tulajdonságaik mellett a feszültségfüggő ioncsatornák tulajdonságaival is rendelkeznek [1]. A Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1 (TRPV1) olyan polimodális szenzor funkciójú ioncsatorna, amelyet számos fizikai és kémiai inger aktivál, pl. a fájdalmas meleg ( $> 43^{\circ}\text{C}$ ) [2], a marokkói kutyatejféleiben található reziniferatoxin (RTX), a piperin, zingeron vagy az eugenol. A fent említettekén kívül a TRPV1 receptort számos endogén eredetű gyulladás- és fájdalomkeltő molekula is képes aktiválni, vagy a perifériás idegvégződésen szenzitizálni. A Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin (TRPA1) a TRPV1-hez hasonlóan számos exogén és endogén liganddal aktiválható, többek közt fájdalmas hideg ingerrel ( $<17^{\circ}\text{C}$ ), fahéjaldehiddel, farnezil-tioszalicilsavval, nikotinnal, hidrogén-szulfid donorvegyületekkel, és formalinnal [3]. A TRPV1 jelenlétét évtizedekig kizárólag neuronális szöveteken feltételezték, az elmúlt években azonban egyre több, nem-neuronális sejttypuson is kimutatták. A receptort és splice-variánsait többek között leírták keratinocitákon, epidermiszben, hízósejteken, dendritikus sejteken, T-limfocitákon, epitelsejteken, vaszkuláris endotelsejteken, ér simaizomsejteken, az orrnyálkahártya szubmukózus mirigyeiben, az urotéliumban, gyomornyálkahártyában, a herékben, pancreasban és a méhben [4]. A funkcionálisan aktív TRPA1 ioncsatornát leírták továbbá az enterochromaffin sejteken, melanocitákon, a hasnyálmirigy béta sejtjein, keratinocitákon, gyomorban, vékony-és vastagbél szöveteiben, valamint méhben is [5], [6].

Endometriózis eredetű krónikus kismencedei fájdalomban emelkedett extraneruális TRPA1 és TRPV1 expressziója figyelhető meg a peritóneumban, illetve emelkedett TRPV1 mRNS szint detektálható ektópiás endometrium sejtekben. Humán embrionális őssejtekből differenciáltatott szenzoros neuronokban 17- $\beta$  ösztadiol és ösztrogénreceptor- $\beta$ -szelektív 2,3-bisz(4-hydroxi-fenil)-propionitril hatására TRPV1 expresszió-növekedés következik be, amely a receptor ösztrogénfüggő expresszióját igazolja [6]. A TRPV1 expresszió ösztrogénfüggése magyarázatul szolgálhat az endometriózis kezelése során alkalmazott, hormonszuppressziót követő tünetcsökkenésre endometriózis-asszociált kismencedei fájdalomban.

## **2. A makrofág migrációt gátló faktor (MIF)**

Felfedezésekor a makrofág migrációt gátló faktor (MIF) volt az első, *in vivo* kísérletekkel bizonyítottan nem immunglobulin szerkezetű immunmediátor [7], amely nemcsak migráció gátlást okoz, hanem képes fokozni a makrofágok felszíni adhézióját és a fagocitózist is [8]. A MIF gyulladás során betöltött szerepe igen sokrétű, egyrészt receptor-mediált módon szabályoz, másrészt endocitózissal a sejtbe jutva fejti ki sokrétű hatását. A MIF-nek számos betegség patogenezisében tulajdonítanak szerepet: endotoxémia és exotoxémia, transzplantátum kilökődés, gyulladásos bélbetegség, emellett szerepet játszik az ez endometrium sejtek proliferációjában és egyes tanulmányok szerint az endometriózis egyik megbízható biomarkere [9], [10].

## **3. A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)**

A TRPV1 és TRPA1 expresszáló szenzoros érzőideg-végződésekből aktivációt követően a számos mediátor szabadul fel, ezek közül külön kiemelendő a PACAP. Vizsgálataink másik fókuszába ez a neuropeptid került, mivel alapvetően gyulladáscsökkentő, neuroprotektív funkcióról ismert, de a gyulladás, fájdalomkezelés irányába is komplex módon szabályozza a patofiziológiai folyamatokat. A PACAP a szekretin-glukagon-vasoaktív intesztinális peptid (VIP) peptidcsalád legkonzerváltabb tagja, amely mlősökben kétféle biológiai formában van jelen: az összes PACAP mintegy 90%-át adja a PACAP 1-38, míg a PACAP 1-27 fragmens kisebb mennyiségben van jelen [11]. A PACAP receptorai széles körben előfordulnak a szervezetben [12], [13], ezen túlmenően a szervezet nem-sejtes kompartmentjeiben is jelen van, amely arra utal, hogy a peptid számos élettani és kórtani folyamatot befolyásolhat. A PACAP és az agyi eredetű neurotrofikus faktor (BDNF) közötti kapcsolat jól dokumentált tény, kérgi neuronokban és asztrocitákban a PACAP fokozza a BDNF expresszióját [14]. A BDNF a neurotrofin család tagja, elsődlegesen az idegsejtek differenciálódásában és növekedésében játszik szerepet, multifunkcionális növekedési faktor jellegükből adódóan számos periférián zajló folyamatban is érintettek. Egy friss tanulmány a BDNF laktáció-dependens expresszióját írja le juhok emlőjében, ahol a BDNF-et, mint parakrin/ autokrin jelet az emlőállomány hormonális stimulációinak eszközeként, és a mikrokörnyezet kialakításában résztvevő kulcsfontosságú faktorként említi [15].

## CÉLKITŰZÉSEK

Kutatómunkám általános célkitűzései a következők voltak:

### **1) A TRPA1 és TRPV1 receptorok, valamint a MIF expressziójának és hormonfüggő regulációjának vizsgálata patkány endometriumban**

A TRPA1 és TRPV1 receptorokat kimutatták humán eutópiás és ektópiás endometriumban, regulációjuk és funkciójuk azonban nem ismert. Ezen túlmenően a női nemi hormonok szintjének e receptorokra kifejtett hatását illetően nem állnak rendelkezésre adatok. Állatmodellek segítségével lehetőségünk nyílik a szexuális érés során bekövetkező változások precíz feltérképezésére, az ösztrogén és gesztagén hatások tisztázására. Célul tűztük ki ezért a TRPA1/V1 receptorok expressziójának vizsgálatát mRNS és fehérjeszinten, valamint hormonfüggő változásaik feltérképezését a MIF-el összehasonlítva patkány endometriumban.

### **2) A TRPA1 és TRPV1 receptorok vizsgálata DIE-ban**

A megfigyelt hormonfüggő TRPA1 és TRPV1 expresszió-fokozódás fényében felmerült bennünk a kérdés, hogy milyen expressziós mintázatot mutatnak a vizsgált receptorok endometriózisban, illetve hogy milyen klinikai paraméterekkel állnak összefüggésben. Ezt a klinikai témát célzó vizsgálatunkat a Pécsi Tudományegyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájával együttműködve, Dr. Bohonyi Noémivel közösen végeztük. Vizsgálataink során a laboratóriumi kísérletek tervezését, a vizsgált gének expressziójának meghatározását, immunhisztokémiai vizsgálatokat jómagam, míg Bohonyi Noémi az orvosi csapat tagjaként a klinikai minták gyűjtését, valamint a klinikai-és fájdalomparaméterek meghatározását végezte.

### **3) A PACAP meghatározása juhok emlőjében és tejében, valamint plazmájában**

Számos tanulmány adatait alapul véve egyértelművé vált, hogy a PACAP és receptorai megtalálhatóak mind humán, mind gazdasági állatok emlőjében és tejében egyaránt. Életkor függő expressziós mintázatukkal, valamint a szoptást követő PACAP koncentráció változással kapcsolatban irodalmi adatok nem ismertek. PhD kutatásom e részében célul tűztük ki *a)* a PACAP koncentrációjának vizsgálatát az idő függvényében szoptás után bárányokban; *b)* a plazma PACAP koncentráció összehasonlítását nőtény juhokban, 3 korcsoportban (bárány, fiatal felnőtt és idős egyedek); *c)* a PACAP mRNS-és fehérjeszintű vizsgálatát a fenti három korcsoport emlőmintáiban; *d)* a PAC1 receptor, a VIP, valamint a BDNF génexpressziós szinten történő meghatározását emlőmintákban, hogy a PACAP szignalizációjához és funkcionális jelentőségéhez közelebb jussunk.

# KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

## 1. Mintagyűjtés

### 1.1. Patkány minták gyűjtése, alkalmazott kezelések

Vizsgálataink során 4 hetes ivaréretlen, valamint 4 hónapos ivarérett nőstény Wistar patkányokat használtunk. A patkányok tartása a PTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetének Állatházában, 24–25 °C-on, standard rágcsáló táppal és víz *ad libitum* fogyasztásával, 12 órás sötét ciklusban történt. *Etikai engedélyszám: BA02/2000-11/2011.* Mindkét korcsoportból 5-5 egyededet méhviaszban oldott és nyakbőr alá beültetett, 100 µg szintetikus ösztrogén analóg dietilstilbösztrolt (DES) tartalmazó implantátummal kezeltük 10 napon át (DES felszabadulás: ~2 µg/nap). További 5-5 patkány 2 mg szezámolajban oldott progeszteront kapott *subcutan* (s.c.) adással 3 egymást követő napon át. Kombinált kezelés során további 5-5 egyed a DES implantációt követően progeszteron kezelésben [16]. Az ivarérett nőstények egy csoportjában (n=5) ovariektómiát végeztünk, a csökkent nemi hormon szintjének tanulmányozása érdekében. Kontrollként placebo kezelt (méhviasz implantátum aktív hatóanyag nélkül, n=5) állatokat használtunk.

### 1.2. Klinikai minták gyűjtése, vizsgálati csoportok

A klinikai minták gyűjtését Dr. Bohonyi Noémi végezte a PTE KK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikán. A klinikai aspektusok bemutatása az ő PhD értekezésének része, jelen dolgozatban csak a molekuláris eredmények értelmezéséhez szükséges legfontosabb betegadatokat ismertetem. A humán műtéti minták 28 betegtől (kor: 18-45 év) származtak, akik 2013 és 2014 között álltak kórházi ellátás alatt krónikus dysmenorrhea (DM) vagy csökkent fertilitás (szubfertilitás) miatt. *Etikai engedélyszám: 5816.*

Az általunk kialakított vizsgálati csoportok felosztása a következő: autológ endometrium [endometriózisos betegek eutópiás endometriuma (n=7)], mélyen infiltráló endometriózis (DIE) lézióból származó ektópiás endometrium (n=15), egészséges szigmabél fal minta a műtéti rezekciós szélről 5 cm-re (n=15), DM-betegek endometriuma [negatív kontroll (n=7)], nem-endometriózis eredetű infertilitás miatt kezelt betegek endometriuma [nőgyógyászati kontroll (n=6)].

### 1.3. Juh minták gyűjtése, vizsgálati csoportok

Vizsgálataink során az őshonos cigája juh fajta plazma-, tej-és emlőmintáit használtuk. A juhek ugyanarról a tenyésztőtelepről származtak, takarmányozásuk *ad libitum* történt. Az állatok

hízalása egy istállóban, kiscsoportos, mélyalmos tartástechnológiában valósult meg. *Etikai engedélyszám: 28/2012 DE MAB.*

#### **A felhasznált állatokból az alábbi kísérleti csoportokat alakítottuk ki:**

1. A szopással összefüggésben vizsgált PACAP38 immunreaktivitás (PACAP38-IR) meghatározásához szükséges vérmintákat 3 hónapos szopós bárányok (n=9) nyaki vénájából vettük szopás előtt (t=0) és szopás után 1 (t=1 h), illetve 2 órával (t=2 h). Összehasonlításként a bárányok anyjának nyaki-és emlővénájából vért vettünk, illetve tejmintát gyűjtöttünk (n=8).
2. A plazma PACAP és VIP koncentrációjának összehasonlítását, valamint az emlő PACAP (mRNS és fehérje), VIP és BDNF mRNS szintű analizisét 3 korcsoportban [bárány, fiatal és idős egyed (n=4/ csoport)] végeztük el az állatok emlőmintáiban.

#### **Vérminták gyűjtése**

Mintavétel előtt az érintett bőrfelszínt minden esetben fertőtlenítettük. A mintákat EDTA-t, (18 mg) és Trasylo<sup>TM</sup>-t (1200 U) tartalmazó hideg vérvételi csövekbe gyűjtöttük, majd centrifugálást követően (200 g 10 percig, majd 2500 g 10 percig, 4°C-on) a felülúszót (plazma) elválasztottuk és felhasználásig -80°C-on tároltuk.

#### **Tejminták gyűjtése**

A vizsgált bárányok anyajuhaiból származó tejminták esetében, a mintagyűjtést reggel végeztük, mindegyik anyaállattól hűtött centrifugacsövekbe 25 ml tejmintát vettünk. A mintákat mintavétel után azonnal -80°C-ra helyeztük. A PACAP38-LI cirkadián változásainak feltérképezése érdekében 4 anyaállattól további tejmintákat gyűjtöttünk (5 ml/ állat/ időpont) az előbbieken részletezett módon, a következő időpontokban: 04:00, 08:00, 12:00, 16:00, 20:00 és 24:00.

#### **Szöveti mintavétel**

A vizsgált gének és a fehérjék szöveti expresszióját juh emlőben poszt mortem vizsgáltuk. Az állatok leölése az Európai Unió Tanácsa által elrendelt, az állatok védelméről és kíméletéről szóló, 1993. december 22-i 93/119/EK szabályait követve történt. Az állatok mindegyikétől a nyaki vénából 10 ml vérmintát vettünk, illetve 1-1 cm<sup>3</sup> emlő- (mirigyes komponens) és uterus mintát.

#### **2. Primer uterus sejtenyészet és az alkalmazott *in vitro* kezelések**

A primer uterus sejtenyészet elkészítéséhez 4 hetes ivaréretlen nőtény patkányokat használtunk. A tenyészet egy részét a 7. napon 18 órán át inkubáltuk 200 pM ER $\alpha$  szelektív 17

$\beta$ -ösztadiollal [17], illetve 200 pM DES-sel. A kezelt sejteken receptor aktivációs vizsgálatot végeztünk intracelluláris kalciummérés segítségével, majd mérés után a sejteket 600  $\mu$ l RNA-Later oldatban vettük fel a génexpressziós vizsgálatok elvégzésének céljából. A felsorolt kísérleti beállításokon kívül DES előkezelt és placebo kezelt 4 hónapos nőtény patkányok felhasználásával is készítettünk a fentebb részletezett módon primer uterus sejt kultúrát. Egy hét elteltével a szubkonfluens sejtenyészetet 24 órán át kezeltük 1  $\mu$ g/ $\mu$ l MIF-el, 330 nM kapszaicinnal illetve 3,3 mM formalinnal, majd valós idejű polimeráz láncreakció (qPCR) segítségével meghatároztuk a TRPA1, TRPV1, indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS) valamint az Il-1 $\beta$  génexpresszióját.

### **3. mRNS expresszió vizsgálata**

Az RNS izolálást RNA-Later-ben tárolt mintákból végeztük 1 ml TRI-reagensben (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA), a gyártó utasításainak megfelelően. DNáz I emésztést követően, 1  $\mu$ g tisztított RNS-ből (patkány uterus sejtenyészete esetében 5 ng RNS átírása történt) cDNS-t szintetizáltunk reverz-transzkripció PCR segítségével (RT-PCR). A cDNS mintákból a célgének relatív expresszióját Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) qPCR készülékkel határoztuk meg. A mérést minden esetben 20  $\mu$ l reakció térfogatban, 20 ng cDNS, 1x Luminaris Color HiGreen Low ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), és 0,3  $\mu$ M primer koncentráció alkalmazásával hajtottuk végre. A minták mérése minden esetben három technikai ismétlésben történt, referenciagénként patkány endometrium minták és patkány uterus primer sejt kultúra esetében esetében a peptidil-prolil-izomeráz A-t, humán endometriózis vizsgálatához riboszomális fehérje L29-et, a juh emlő minták analizéséhez pedig  $\beta$ -aktint használtunk. A mérés során végrehajtott disszociációs görbe analízis az amplifikációs reakció specifikusságát igazolta. A génexpresszió mértékét a  $\Delta\Delta C_t$  metódus szerint számítottuk [18].

### **4. Immunhisztokémia**

Immunhisztokémiai vizsgálatainkat paraffinba ágyazott szövetmintákból 4  $\mu$ m vastagságú metszeteken végeztük. Patkány uterus minták esetében a metszeteket 1:1000-es hígításban nyúl poliklonális anti-TRPV1, (Neuromics, Edina, MN, USA), anti-TRPA1 (Abcam, Cambridge, UK) és anti-MIF (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) antitesttel inkubáltuk. Humán klinikai minták esetében majd a metszeteket anti- TRPV1 (GP14100, Neuromics, Edina, MN, USA) és anti- TRPA1 (ab68847, Abcam, Cambridge, UK) elsődleges antitesttel inkubáltuk. Az immunhisztokémiai reakciókat mindkét esetben 0,01% hidrogén-peroxidot tartalmazó diamino-benzidin (DAB) oldattal tettük láthatóvá, háttérfestést hematoxilinnel végeztünk. A

szövetteni metszetekről nagyfelbontású kamerával (Olympus BX51) digitális képeket készítettünk.

### **5. Intracelluláris kalciumion-beáramlás mérése fluoreszcens módszerrel**

A mérés a fura-2 acetoxi-metilészter (fura-2 AM) fluoreszcens kalcium-indikátor festék kalciumion megkötő képességén alapul, amely alkalmas szabad kalciumionok megkötésére. A  $\text{Ca}^{2+}$ -t kötött fluoreszcens festék abszorpciós maximuma (340 nm) eltér a  $\text{Ca}^{2+}$ -t nem kötött formától (380 nm), így a két hullámhosszon való gerjesztést követően az emittált fény intenzitásának hányadosából az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szint meghatározható. A festékekkel töltött endometrium sejteket tartalmazó üveglemezt speciális mérőkádban, fluoreszcens mikroszkóp (Olympus BX50WI) segítségével vizsgáltuk. A TRPV1 esetében 330 nM kapszaicinnal, a TRPA1 esetében pedig 3,3 mM formalin adásával váltottunk ki receptor aktivációt. A sejtek életképességét 50 mM KCl oldat áramoltatásával ellenőriztük.

### **6. PACAP radioimmunoassay (RIA)**

A PACAP38- IR meghatározását plazmában és emlőmintákban PACAP38 specifikus, szenzitív radioimmunassay (RIA) módszerrel végeztük, a peptid koncentrációját standard kalibrációs görbe segítségével számítottuk [19], [20]. Az „ab 35342” PACAP38 antiszérumot (Abcam, Cambridge, UK) juhok immunizálásával, szintetikus peptid segítségével állították elő, amely a PACAP 14 aminosav hosszúságú C-terminális fragmensére specifikus. A RIA standard előállításához 8-2000 fmol/ ml koncentrációban szintetikus PACAP peptidet használtunk. Vér esetében a PACAP38 tartalom megállapításához 2 ml plazmát, tej esetében 1 ml natív tej mintát, emlőmintáknál pedig 280 mg szövetet használtunk fel. Az ellenanyaghoz kötött radioaktivitás értékek alapján a kalibrációs görbe segítségével állapítottuk meg az ismeretlen mintához tartozó PACAP38- IR-t.

### **7. VIP kimutatása enzimmel kötött immunszorbens módszer segítségével (ELISA)**

A VIP koncentráció mértékét bárányok plazmájában a szopással összefüggésben illetve anyajuhok plazma és tejmintáiban specifikus ELISA módszer segítségével határoztuk meg gyártó utasításainak megfelelően (Sincere™, Sincere Co., Beijing, Kína). Az alkalmazott kit detektálási tartománya 7,8- 500 pg/ml, az esszé érzékenysége <2,0 pg/ml. A mérést két technikai ismétlésben végeztük el, a 450 nm-hez tartozó optikai denzitást Multiskan RC microplate reader (Labsystems, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével határoztuk meg (a referencia hullámhossz 630 nm volt). Az egyes minták VIP koncentrációját a standard hígítási sor alapján készített kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg.



## EREDMÉNYEK

### **1. A TRPA1 és TRPV1 ioncsatornák, valamint a MIF jelenléte és ösztrogén kezelés hatására bekövetkező expresszió-változása patkány endometriumban**

A TRPA1 receptor esetében DES kezelés hatására szignifikáns, 2,5-szeres génexpresszió-emelkedést mértünk ivaréretlen, és 8-szoros fokozódást ivaréretlen patkányok endometriumban. A progeszteronkezelés önmagában nem volt hatással a TRPA1 expresszióra, sőt DES-sel kombinált alkalmazását követően a DES expressziót fokozó hatás elmaradását tapasztaltuk. A TRPV1 receptor esetében is markáns, 5-szörös expresszió-fokozódást tapasztaltunk ivaréretlen, és ~ 6,8-7-szeres emelkedést ivarérett patkányok endometriumban. Progeszteronkezelést követően a TRPV1 expresszióban nem detektáltunk a kontrolltól eltérő változást. DES-sel kombinálva ez esetben is elmaradt az ösztrogén analóg vegyület hatására bekövetkező génexpresszió emelkedés. A TRPA1 esetében tapasztaltakkal azonos módon sem az ovariectomizált, sem az álműtött csoportban nem mértünk szignifikáns expresszió-növekedést. A MIF esetében DES kezelés hatására kismértékű, szignifikáns génexpresszió-fokozódást mértünk, amely ivaréretlen patkányok esetében 2,5-szeres, ivarérettekben 1,5-szörös volt. Progeszteronnal kombinált adás esetén ez a növekedés a MIF esetében is elmaradt. A progeszteron kezelés önmagában illetve az ovariectomia nem okozott expresszió növekedést (statisztika: egy utas ANOVA, Dunnett post-hoc teszt).

### **1. 2. A TRPA1/V1 és MIF génexpressziójának változása *in vitro* DES kezelés hatására endometrium sejt kultúrában**

DES inkubáció hatására a TRPA1 receptor mRNS mennyisége 10-szeresére, a TRPV1 receptoré 17-szeresére, a MIF-é pedig 5-szörösére emelkedett a sejtekben. A szintén 200pM koncentrációjú 18 órás ER $\alpha$ - szelektív 17 $\beta$ -ösztradiol előkezelést követően a TRPA1 receptor és a MIF esetében nem detektáltunk génexpresszió-változást, míg a TRPV1 mRNS mennyisége 5-szörösére emelkedett a sejtekben (statisztika: egy utas ANOVA, Dunnett post-hoc teszt).

### **1. 3. A TRPA1/V1 és MIF fehérje lokalizációja és hormonfüggő növekedése patkány endometriumban**

Kezeletlen 4 hetes állatokban minimális TRPA1 immunpozitivitás detektálható az epitel rétegben. Ez a kismértékű pozitívitas DES-kezelt állatokban emelkedést mutat, a statisztikailag szignifikáns mértéket progeszteronnal kombináltan éri el. A progeszteron kezelés önmagában nem befolyásolja a TRPA1 fehérje expresszióját. Intakt 4 hónapos patkányok esetében gyenge/mérsékelt TRPA1 fehérje expressziót detektáltunk, amely főként az epitel rétegre

illetve a mirigyek területére lokalizálódott, sztrómális sejtek esetében elszórt jelölődés volt megfigyelhető. A DES-, progeszteron és a kombinált kezelés, valamint az ovariectomia is szignifikáns expresszió-fokozódást eredményezett az epitéliumban és a mirigyek környékén. Ivaréretlen állatokban esetében a TRPV1 immunpozitivitás mértéke szignifikánsan megemelkedett DES-kezelés után a sztrómában és a mirigyekben, emellett a progeszteronkezelés is szignifikáns expresszió-fokozódást eredményezett. DES-sel kombinálva szignifikáns változást nem tapasztaltunk. A TRPV1 receptor tekintetében, a 4 hónapos patkányokban gyenge immunpozitivitást detektáltunk elsődlegesen a sztrómában és a mirigyek közelében a kontroll csoportban. A DES- valamint a progeszteron kezelés önmagában fokozta a TRPV1 expresszióját, kombinációban adva a szignifikáns emelkedést azonban nem mértünk. Az ovariectomia nem volt hatással a TRPV1 fehérje mennyiségére.

Ivaréretlen egyedek esetében, kontroll állatokban moderált immunpozitivitást figyeltünk meg. DES kezelés hatására emelkedett MIF expressziót detektáltunk az epitel rétegben és a környező sztrómában is. A statisztikailag szignifikáns értéket progeszteron és kombinált kezelést követően detektáltuk. Ivarérett állatokban, MIF immunreaktivitás tekintetében mérsékelt pozitívitást detektáltunk a kontroll csoportban. DES- illetve progeszteron-kezelést követően kismértékű fokozódást tapasztaltunk az epitéliumban valamint a sztrómában. Statisztikailag szignifikáns fokozódást a progeszteron kezelés hatására mértünk, amely a fokális epitelrétegre koncentrált (statisztika: Kruskal-Wallis többszörös összehasonlító próba, Dunn post-hoc teszt).

#### **1. 4. A TRPA1/V1 funkcionális vizsgálata patkány primer uterus sejt kultúrában**

Mind a TRPA1 agonista formalin (3,3 mM), mind pedig a TRPV1 aktivátor kapszaicin (330 nM)  $Ca^{2+}$ -beáramlást eredményezett az endometrium sejtekbe, amely bizonyítja, hogy a sejtek felszínén funkcionális receptorok találhatók. A válaszadó sejtek aránya a TRPV1 aktiváció során 10,84% (4 válaszadó sejt 37-ből), TRPA1 esetében pedig 13,5% (5 válaszadó sejt 37-ből) volt. A kapszaicin azonnali választ váltott ki, amely 2 perc mosási lépés után is megismételhető volt. Formalin aktiváció során 30-60 másodperc látenciaidő után detektáltunk kalciumjelet.

#### **1. 5. TRPA1/V1 receptoraktiváció hatása az IL1- $\beta$ és iNOS génexpresszióra endometriumsejtekben**

TRPV1 agonista kapszaicin hatására az iNOS génexpressziója 15-szörösére, az IL-1 $\beta$  expressziója pedig 10-szeresére emelkedett endometrium sejtekben. A TRPA1 agonista formalin kezelést követően mindkét gén esetében körülbelül 10-szeres expressziófokozódást tapasztaltunk (statisztika: egy utas ANOVA, Dunnett post-hoc teszt).

## **1. 6. TRPA1/V1 expressziónövekedése primer uterus sejt kultúrájában MIF kezelést követően**

MIF kezelést követően a TRPA1 génexpressziója kb. 3-szorosára emelkedett a primer uterus sejtekben, amely DES előkezelt állatok uterus sejtjeiben fokozottabban jelentkezett (~10-szeres növekedés). A TRPV1 receptor esetében a sejtek MIF-fel történő kezelése önmagában nem okozott változást a génexpresszióban. DES-előkezelt patkányok uterus sejtjeiben ~2,5-szörös expresszió-fokozódást tapasztaltunk az oldószerrel kezeltékhez viszonyítva (statisztika: egy utas ANOVA, Dunnett post-hoc teszt).

## **2. A TRPA1 és TRPV1 receptorok expressziója DIE-ban**

### **2.1. A TRPA1/V1 mRNS expresszió-fokozódása DIE lézióban**

Mind a TRPA1, mind a TRPV1 receptort detektáltuk mRNS és fehérjeszinten is normál humán endometriumban. Rectosigmoid DIE lézióban szignifikáns, 5-6-szoros TRPA1 mRNS expresszió-növekedést mértünk az eutóp endometriumhoz hasonlítva. A TRPV1 receptor szintén szignifikáns, 2-szeres génexpresszió-növekedést mutatott a DIE léziókban, ezen kívül autológ eutópiás endometrium mintákban is emelkedett expressziót mértünk. A rectosigmoid bélfal és a DM betegekből származó endometrium minta sem TRPA1 sem pedig TRPV1 mRNS expresszió tekintetében nem mutatott eltérést az egészséges mintákhoz képest (statisztika: Mann-Whitney U-teszt).

### **2.2. A TRPA1 és TRPV1 fehérje lokalizációja és emelkedése DIE mintákban**

Egészséges endometriumban elszórt TRPA1/V1 immunpozitivitás detektálható a sztrómális és epitél sejtekben. DIE mintákban erőteljes intracelluláris TRPA1 és TRPV1 expressziót detektáltunk mindkét kompartmentben, emellett a normál endometriumhoz hasonlóan a glanduláris epitéliumban található erőteljesen festődés. Az immunhisztokémiai metszetek szemikvantitatív analízise során emelkedett TRPA1 immunpozitivitást detektáltunk a DIE léziók epiteliális területein, emellett különbséget mértünk DIE léziók strómális és epiteliális kompartmentjei között is. A TRPV1 receptor esetében markáns, körülbelül 10-szeres fehérje expresszió-fokozódást detektáltunk az epitéliumban, a sztrómális komponens tekintetében pedig 5-szörös emelkedést detektáltunk. A TRPA1-hez hasonlóan, a DIE mintákon belül az epiteliális TRPV1 expresszió szignifikánsan emelkedettebb volt, mint a sztrómális (statisztika: egy utas ANOVA, Bonferroni összehasonlítás).

### **2.3. A TRPA1/V1 immunpozitivitás korrelációja DIE-asszociált klinikai paraméterekkel**

A DIE-asszociált fájdalomparaméterek tekintetében erős pozitív korrelációt detektáltunk a DM súlyossága és a strómális TRPA1 és TRPV1 immunpozitivitás emelkedése között. A dyspareunia súlyossága szintén pozitív korrelációban állt az ektópiás endometriumsejtek és peritoneális makrofágok TRPV1 pozitívításának emelkedésével. Az epitelális TRPA1 és a strómális TRPV1 expresszió-fokozódás erős korrelációt mutatott a dyschezia súlyosságával (statisztika: Pearson illetve Spearman korrelációs koefficiens).

### **3. A PACAP vizsgálata juh emlő-és tejmintákban, valamint szopós bárányok plazmájában**

#### **3.1. PACAP38-IR juh plazmában, és bárányokban történő emelkedése szopás után**

A specifikus RIA technikával mért PACAP38 koncentrációja bárányokban szopás előtt 20 fmol/ml volt. Ez a peptidkoncentráció a szopást követően egy órával szignifikánsan, kb. 1,5-szeresére emelkedett, majd szopás után 2 órával visszatért a kiindulási értékhez. A PACAP38-IR mértéke juh tejmintákban nagyságrendekkel, kb. 10-szer nagyobb volt, mint ugyanazon tejelő anyák nyaki vénájából vett vérmintáiban. A nyaki és emlővénából vett vérminták PACAP38 koncentrációi között nem detektáltunk különbséget. A nap különböző időpontjaiban vett tejminták eredményeiből kitűnik, hogy a tejben lévő PACAP mennyisége független a diurnális ciklustól (statisztika: egy utas ANOVA, Dunnett post-hoc teszt).

#### **3.2. A PACAP mRNS-és fehérje expressziójának változásai juh emlőben**

A különböző korcsoportokban a PACAP génexpresszió tekintetében nem detektáltunk szignifikáns eltérést. A PACAP fehérje expressziója 3 éves juhokban szignifikánsan, 3-szorosára emelkedett a bárányokhoz képest, illetve magasabb értéket mutatott idős állatokban is. Ebben a csoportban az egyes egyedek koncentráció értékei nagyobb varianciát mutattak (statisztika: Mann-Whitney U-teszt).

#### **3.3. A VIP expressziójának vizsgálata juh emlőben, illetve plazma-és tejmintákban**

A vizsgált emlőmintákban a PACAP-pal rokon VIP peptid mRNS expresszióját az alkalmazott primerek segítségével a pozitív kontrollként alkalmazott uterus mintákkal ellentétben egyik korcsoport esetében sem tudtuk kimutatni. Bárányok plazmamintáiban a szopás előtt közvetlenül ~20 pg/ml VIP-et detektáltunk. Ez az érték a szopást követően egyik időpontban

sem változott szignifikánsan. Anyajuhok tejsavójában a PACAP-hoz hasonlóan, szignifikánsan magasabb VIP koncentrációt mértünk a tőgy, illetve nyaki vénához hasonlítva. A plazma VIP koncentrációja az életkorral nem változik, hasonló értékeket detektáltunk bárányok, valamint fiatal felnőtt és idős egyedek esetében is (statisztika: egy utas ANOVA, Dunnett post-hoc teszt).

#### **3.4. A PAC1 receptor és a BDNF génexpressziójának vizsgálata emlőben**

A PAC1 receptor génexpressziója nem mutatott szignifikáns eltérést egyik korcsoportban sem. A korcsoportok közül a 10 éves állatokban detektáltuk a legmagasabb PAC1 mRNS szintet. A BDNF génexpressziója az életkor előrehaladtával fokozatosan csökken, 3 éves állatok emlőmintáiban a bárányokhoz képest 30%-os, 10 éves állatokban pedig mintegy 60%-os génexpresszió-csökkenést detektáltunk (statisztika: Mann-Whitney U-teszt).

## MEGBESZÉLÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Munkánk első részében bemutatott eredményeink az első bizonyítékot szolgáltatják a TRPA1 receptor mRNS expressziójára patkány endometriumban, valamint a TRPA1 és TRPV1 receptorok expresszió növekedésére szintetikus ösztrogén analóg vegyület hatására a MIF-fel korrelációban. A megfigyelt, ösztrogén-indukált TRPA1/V1 és MIF mRNS- növekedés alapján feltételezzük, hogy mind a receptorok, mind pedig a MIF részt vesznek a normál endometrium funkciók kialakításában a reprodukciós ciklus során. Jelen eredményeink hozzájárulhatnak patológiás, gyulladással és fájdalommal járó nőgyógyászati kórképek jobb megértéséhez [21], [22]. Primer uterus sejt kultúráján végzett receptor aktivációs vizsgálat segítségével bizonyítottuk, hogy a receptorok funkcionális állapotban vannak jelen az endometrium sejtek felszínén. A TRPA1 agonista formalin [23] és TRPV1 agonista kapszaicin előkezelt sejtekben emelkedett iNOS és IL-1 $\beta$  expresszió növekedést detektáltunk, amely szintén a receptorok nem-neurális aktivációjához köthető. E mediátorok a ciklus során feltételezhetően részt vesznek az endometrium lokális szabályozásában, ezen belül az NO-közvetített vazodilatációban, valamint az ovuláció, terhesség és decidualizáció során [24]. Kísérleteink során a MIF kezelés növelte mind a TRPA1, mind a TRPV1 relatív génexpresszióját endometrium sejteken, valamint kimutattuk, hogy ebben a rendszerben a DES szinergista módon hat. A progeszteron a receptorok mRNS szintjét nem változtatta meg, fehérjeszinten azonban megnövelte azt ivaréretlen és ivarérett nőtény patkányokban. Ez a hatás valószínűleg a progeszteron  $\beta_2$ -adrenerg receptor moduláló tulajdonságának következménye, amely indirekt módon képes a TRPV1 jelátvitel befolyásolására. Eredményeink alapján valószínűsíthetjük, hogy az endometrium sejtek a hátsó gyöki ganglion sejtekhez hasonlóan ösztrogén-függő expressziós mintázattal rendelkeznek. A TRP receptorok szerepet játszhatnak egyes ösztrogén hatásra aktiválódó jelátviteli útvonalak működésében. A többi kation csatornához hasonlóan a TRPA1/V1 receptorok barrier molekulaként részt vehetnek a homeosztázis fenntartásában, a Ca<sup>2+</sup> jelátvitelben, a sejtosztódásban és differenciációban, szabályozhatják az endometrium válaszkészségét, az embrió implantációt valamint szenzoros ideg-immun interakciókat közvetíthetnek [4].

A vizsgálataink során nyert eredmények illeszkednek a továbbiakban humán mélyen infiltráló endometriózis mintákon kapott megfigyelésekhez és más irodalmi adatokhoz. Az endometriózis során detektálható emelkedett ösztrogénszint hatásai miatt a két terület összekapcsolható egymással. A TRPA1- és TRPV1 expresszáló nem-neurális endometrium

sejtek valószínűleg ösztrogén mediált szenzoros, szekrétoros, gyulladáskeltő és fájdalomközvetítő szereppel bírnak patológiás körülmények között.

Értekezésem második részében bemutatott eredményeink szolgáltatják az első bizonyítékot a TRPA1 receptor jelenlétére normál humán endometriumban és a TRPA1 és TRPV1 receptorok expresszió-emelkedésére DIE léziókban. Az endometriózisra jellemző viszonylag magas prevalencia, az érintett betegek rossz életminősége és fertilitási problémái hívják fel a tudományos közösség figyelmét a kórképre. A lokális gyulladással összefüggő krónikus fájdalom patogenezisében, melynek kialakulásáért számos pro-inflammatórikus molekula felelős. A TRP receptorokat expresszáló idegi struktúrák nemcsak afferens funkciókkal rendelkeznek, hanem vazóaktív, pro-és anti-inflammatórikus neuropeptidok felszabadítására is képesek [1]. Vizsgálataink során emelkedett TRPA1 és TRPV1 génexpressziót figyeltünk meg endometriózisos betegek eutópiás endometriumában, amely eredmények összhangban állnak egyéb kutatási eredményekkel, melyek során a TRPV1 expresszió lokális emelkedését figyelték meg endometriózisos léziókban. A detektált TRPA1 és TRPV1 fehérje expresszió-növekedés a rectosigmoid DIE léziók sztrómális és epitel rétegeiben a receptorok szenzoros funkcióinak meglétét feltételezik. Egyre több bizonyíték támasztja alá azt a hipotézist, miszerint a TRPV1 expresszáló idegvégződés kulcsszerepet töltenek be az endometriózissal összefüggő alhasi fájdalom kialakulásában. Peritoneális endometriózisos környezetben a TRP receptorok interferálhatnak a gyulladással, így növelve a betegek fájdalomérzetét és elősegítve a krónikus fájdalom létrejöttét. A nem-neurális TRPV1 receptort a neurálisnál alacsonyabb aktivációs küszöb jellemzi, farmakológiai aktivációjuk hatására a sejtekből NO és IL-1 $\beta$  felszabadulás következik be [21]. Ennek analógiájára DIE esetében a léziókban kifejeződő TRPV1 receptor aktiválásának következtében is ugyanez a hatás feltételezhető. Ezen túlmenően, a pro-inflammatórikus kaskád aktivációjának eredményeként a nem-neurális TRPV1 szenzitivizációja is bekövetkezhet, amely gyulladással összefüggő körfolyamatot indukál [25]. Az idegvégződéseken található TRPA1 és TRPV1 között lejátszódó keresztaktiváció és a nem-neurális receptorok aktiválódása perifériás szenzitivizáció és nocicepció kialakulásához vezet [4]. A kialakuló hosszantartó perifériás szenzitivizáció olyan központi idegrendszeri változásokat indukál, amely magyarázatul szolgál a betegek körében tapasztalható egyénenként is eltérő fájdalomérzet változatosságára, az endometriózisos típusától és súlyosságától függetlenül [26]. A sztrómális TRPA1 és TRPV1 immunreaktivitás korrelációt mutat a DM súlyosságával, az ektópiás epitelsejteken és makrofágokon kimutatott TRPV1 expresszió pedig a dyspareuniával.

A dyschezia erőssége egyformán korrelál mindkét receptor strómális és epiteliális expressziójával. Egyre több bizonyíték támasztja alá egy ok-okozati viszony jelenlétét az endometriózis és a vizsgált fájdalomparaméterek között, amely viszcero-viszcerális szenzitivizációs mechanizmusokra és neurogén komponensekre vezethető vissza. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a DIE lokálisan, a colon TRPA1/V1 expresszálo afferenseinek szenzitivizációja révén neuropeptidek (P-anyag, CGRP) felszabadulását eredményezi, amely végül neurogén gyulladás és perzisztáló fájdalom kialakulásához vezet.

Munkánk harmadik részében bemutatott kutatási eredményeink szolgáltatják az első bizonyítékot a PACAP expressziójára laktáló juhok emlőjében, valamint kimutattuk, míg a peptidcsalád másik tagja, a VIP nem expresszálódik ebben a szövetben. Annak ellenére, hogy az anyatejből az újszülött keringésébe kerülő PACAP mennyisége nem ismert, szopós bárányok plazmájában a szopás után egy órával emelkedett PACAP koncentrációt mértünk. Eredményeink a PACAP gyors felszívódását valószínűsítik, bár a szopás által kiváltott endogén PACAP felszabadulása sem zárható ki. Tanulmányok bizonyítják, hogy a tehéntej az emberivel nagyjából megegyező mennyiségű PACAP-ot tartalmaz, melynek jelentősége kiemelten fontos, tekintve, hogy a forgalomban kapható tápszerek tehéntejalapú készítmények. A peptid kérődző állatok tejében (szarvasmarha, juh, kecske) a plazmához képes tízszeres mennyiségben van jelen, amely anyajuhok tejében még emelkedettebb a laktáció első három hónapjában [27]. Kísérleteink során nem figyeltünk meg cirkadián függő PACAP koncentrációt a tejben és nem találtunk különbséget a nyaki-és emlővéna PACAP koncentráció értékeiben sem. Eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy a tejben mérhető nagy mennyiségű peptid részben az emlőben lévő mirigysejtekből, részben pedig az anyai keringésből származhat. Ismert tény, hogy a PACAP befolyásolja a vaszkuláris endoteliális növekedési faktorok szintézisét, emellett hatással van számos citokin és kemokin lokális expressziójára is [28]. Annak ellenére, hogy a VIP a prolaktin felszabadulás szabályozásán keresztül központi szereppel bír a laktáció szabályozásában, egy korábbi közleményt megerősítve a vizsgált emlőszövetmintákban nem detektáltunk VIP specifikus mRNS-t egyik korcsoportban sem [29]. Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a VIP a PACAP-hoz hasonlóan nagyságrendekkel magasabb koncentrációban van jelen a tejben, eredményeinket összegezve tehát feltételezhetjük, hogy a tejben lévő VIP az anyai keringésből származik. A központi idegrendszerben a PACAP és a VIP részt vesz a neurotrofikus faktor BDNF regulációjában. Vizsgálatainkban az életkorral fordítottan arányos, szignifikáns BDNF expresszió-csökkenést detektáltunk, míg a PACAP expresszió tekintetében

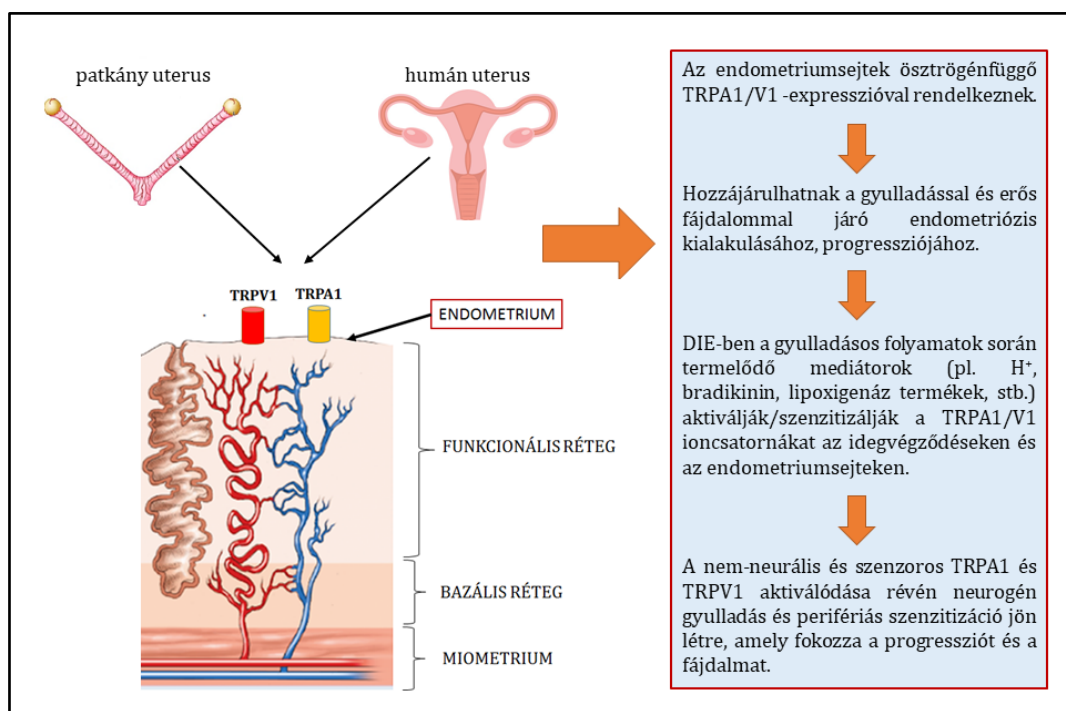


nem volt különbség. Ez az eredmény a BDNF potenciális szerepére utal az emlő korai fejlődése során, melynek részletes tisztázásához, valamint a PACAP és BDNF között fennálló összefüggések felderítéséhez további vizsgálatok szükségesek. Munkánk során specifikus RIA technikával bizonyítottuk, hogy a PACAP nagy mennyiségben és konstans módon van jelen juhok tejében. Eredményeinket összegezve feltételezzük, hogy a tejben lévő nagyfokú PACAP akkumuláció az anyai vérkeringésből történő infiltráció és emlő peptid termelésének együttes következménye. Valószínűsítjük, hogy a szopós bárányok plazma PACAP38-IR értékének növekedése a tejben lévő PACAP gyors felszívódásának következtében alakul ki, fontos azonban megjegyezni, hogy a bárányokban szopás hatására bekövetkező endogén eredetű PACAP felszabadulása is lehetséges. Vizsgálataink új perspektívát szolgáltatnak a PACAP szerepének szélesebb körű feltérképezéséhez, illetve a peptid újszülöttekben és az emlőben betöltött szerepére vonatkozóan.

## ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS EGYSÉGES ÉRTELMEZÉSE

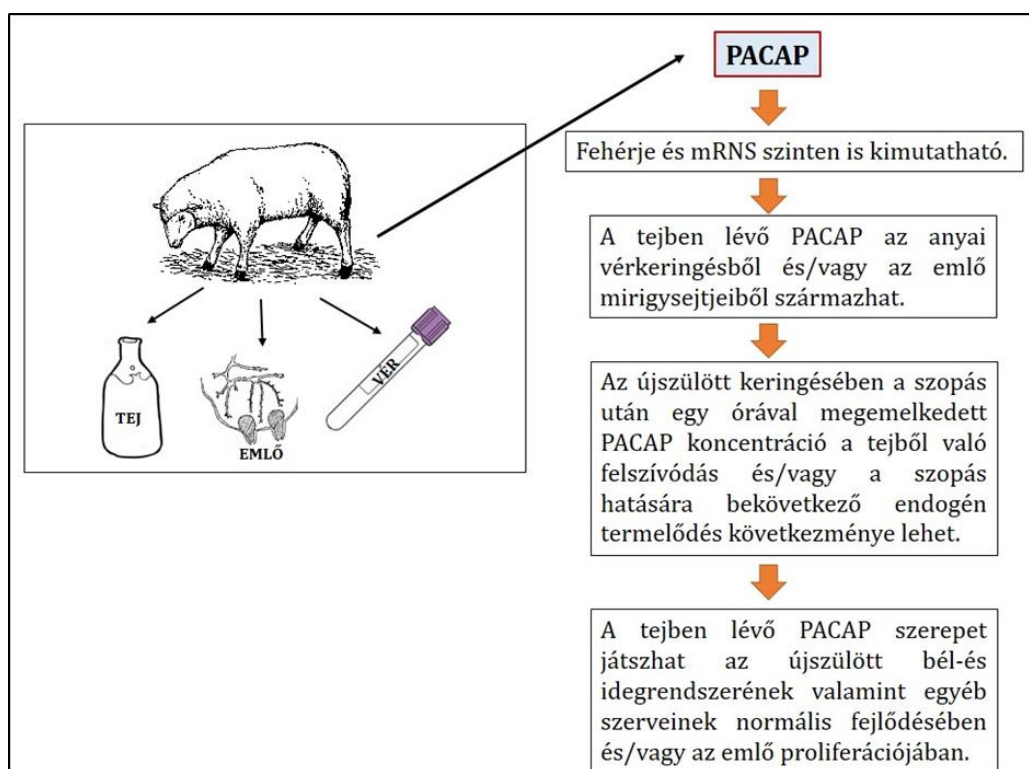
1) Kísérleteink során elsőként bizonyítottuk funkcionálisan aktív nem-neurális TRPA1 és TRPV1 ioncsatornák expresszióját a MIF-fel összefüggésben patkány endometriumban. DES- és MIF kezelések hatására szignifikáns TRPA1/V1 expresszió-növekedést detektáltunk. TRPA1 és TRPV1 agonista kezelés emelkedett gyulladáshoz vezető mediátor (iNOS és IL-1 $\beta$ ) növekedést eredményezett, amely a vizsgált ioncsatornák endometriumsejteken át megvalósuló jelátvitelét igazolta. Az endometrium sejtek ösztrogén-függő TRPA1/V1 expressziót mutatnak, és szerepet játszhatnak ösztrogén hatásra aktiválódó jelátviteli útvonalak működésében, melyek szenzoros, szekretoros, gyulladáskeltő és fájdalomközvetítő szereppel bírnak patológias körülmények között.

2) Humán egészséges és DIE lézió mintákban elsőként írtuk le a TRPA1 és TRPV1 receptorok jelenlétét, valamint kimutattuk, hogy a TRPA1 ioncsatorna az endometriózisos mintákban szignifikánsan nagyobb mennyiségben van jelen. DIE lézió a béltraktusban mechanikai és kémiai stimulusok révén szenzitizálhatja a TRPA1 és TRPV1 receptort, amely lokális neuropeptid felszabaduláshoz vezet, ezáltal neurogén gyulladást és perzisztens fájdalmat idéz elő.



**Eredmények összegzése I:** A nem-neurális TRPA1 és TRPV1 ioncsatornák szerepe patkány és humán endometriumban, valamint mélyen infiltráló endometriózisban (DIE).

3) A PACAP konstanst módon van jelen juhok plazmájában, minden vizsgált korcsoportban, koncentrációját a kor jelentősen nem befolyásolja. Juhtejben nagyságrendekkel magasabb peptid koncentráció mérhető, mint a plazmában, A tejben lévő PACAP akkumuláció az anyai vérkeringésből történő szekréció és az emlő peptidtermelésének együttes következménye lehet. Szopós bárányok plazmájában a szopás után 1 órával szignifikáns PACAP38-IR növekedés mérhető, melynek kialakulása PACAP38 gyors felszívódásának és/vagy a peptid szopás hatására történő termelődésének következménye lehet. Annak ellenére, hogy a VIP központi szabályozó szerepe bizonyított a laktáció során, az általunk vizsgált kísérletekben az emlőszövet és plazmamintákban nem detektáltunk VIP expressziót ill. változásokat.



**Eredmények összegzése II.:** Anyajuhok és bárányok plazmájában és tejében jelen lévő PACAP potenciális szerepének összefoglalása.

## IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Szolcsányi J., “Antidromic vasodilatation and neurogenic inflammation,” *Agents Actions*, vol. 23, no. 1–2, pp. 4–11, 1988.
- [2] Tominaga M. *et al.*, “The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli,” *Neuron*, vol. 21, no. 3, pp. 531–543, 1998.
- [3] Baraldi P. G., Preti D., Materazzi S., and Geppetti P., “Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) Channel as Emerging Target for Novel Analgesics and Anti-Inflammatory Agents,” *J. Med. Chem.*, vol. 53, no. 14, pp. 5085–5107, 2010.
- [4] Fernandes E. S., Fernandes M. A., and Keeble J. E., “The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 166, no. 2, pp. 510–521, 2012.
- [5] Fernandes E. S., Fernandes M. A., and Keeble J. E., “The functions of TRPA1 and TRPV1: Moving away from sensory nerves,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 166, no. 2, pp. 510–521, 2012.
- [6] Greaves E., Grieve K., Horne A. W., and Saunders P. T., “Elevated peritoneal expression and estrogen regulation of nociceptive ion channels in endometriosis,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 99, no. July, p. jc20142282, 2014.
- [7] David J. R., “Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 56, no. 1, pp. 72–77, 1966.
- [8] Nathan C. F., Karnovsky M. L., and David J. R., “ALTERATIONS OF MACROPHAGE FUNCTIONS BY MEDIATORS FROM LYMPHOCYTES,” *J. Exp. Med.*, vol. 133, no. 6, pp. 1356–1376, 1971.
- [9] Bernhagen J., Calandra T., and Bucala R., “Regulation of the immune response by macrophage migration inhibitory factor: biological and structural features,” *J Mol Med*, vol. 76, no. 3–4, pp. 151–161, 1998.
- [10] Calandra T. *et al.*, “Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor,” *Nat Med*, vol. 6, no. 2, pp. 164–170, 2000.
- [11] Arimura A., “Perspectives on Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) in the Neuroendocrine, Endocrine, and Nervous Systems,” *Jpn. J. Physiol.*, vol. 48, no. 5, pp. 301–331, 1998.
- [12] Ishihara T., Shigemoto R., Mori K., Takahashi K., and Nagata S., “Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide,” *Neuron*, vol. 8, no. 4, pp. 811–819, 1992.
- [13] Mezey É. *et al.*, “Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 7, pp. 3655–3660, Mar. 2000.
- [14] Pellegri G., Magistretti P. J., and Martin J. L., “VIP and PACAP potentiate the action of glutamate on BDNF expression in mouse cortical neurones,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 10, no. 1, pp. 272–280, 1998.
- [15] Colitti M., “Expression of NGF, BDNF and their high-affinity receptors in ovine mammary glands during development and lactation,” *Histochem. Cell Biol.*, vol. 144, no. 6, pp. 559–570, 2015.
- [16] Garai J. and Clark J. H., “Tyrosinase-like activity and estradiol binding in rat uterine nuclear extracts,” *Steroids*, vol. 57, no. 5, pp. 248–256, May 1992.
- [17] Herbison A. E., “Rapid actions of oestrogen on gonadotropin-releasing hormone neurons; from fantasy to physiology?,” *J. Physiol.*, vol. 587, no. Pt 21, pp. 5025–5030, Nov. 2009.
- [18] Pfaffl M. W., “A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 29, no. 9, p. e45, 2001.
- [19] Helyes Zs. *et al.*, “Inhibitory effect of PACAP-38 on acute neurogenic and non-neurogenic inflammatory processes in the rat,” *Peptides*, vol. 28, no. 9, pp. 1847–1855, Sep. 2007.
- [20] Jakab B. *et al.*, “Distribution of PACAP-38 in the central nervous system of various species determined by a novel radioimmunoassay,” *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 61, no. 1–2, pp. 189–198, Oct. 2004.

- [21] Liu J., Liu X., Duan K., Zhang Y., and Guo S.-W., “The Expression and Functionality of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 in Ovarian Endometriomas,” *Reprod. Sci.*, vol. 19, no. 10, pp. 1110–1124, 2012.
- [22] Akoum A., Metz C. N., Al-Akoum M., and Kats R., “Macrophage migration inhibitory factor expression in the intrauterine endometrium of women with endometriosis varies with disease stage, infertility status, and pelvic pain,” *Fertil. Steril.*, vol. 85, no. 5, pp. 1379–1385, 2006.
- [23] Sághy É. *et al.*, “Evidence for the role of lipid rafts and sphingomyelin in Ca<sup>2+</sup>-gating of Transient Receptor Potential channels in trigeminal sensory neurons and peripheral nerve terminals,” *Pharmacol. Res.*, vol. 100, pp. 101–116, Oct. 2015.
- [24] Wira C. R., Fahey J. V., Ghosh M., Patel M. V., Hickey D. K., and Ochiel D. O., “Sex Hormone Regulation of Innate Immunity in the Female Reproductive Tract: The Role of Epithelial Cells in Balancing Reproductive Potential with Protection against Sexually Transmitted Pathogens,” *Am. J. Reprod. Immunol.*, vol. 63, no. 6, p. 10.1111/j.1600-0897.2010.00842.x, 2010.
- [25] Mita S., Shimizu Y., Satoskar A. R., Notsu T., Imada K., and Kyo S., “Dienogest inhibits nerve growth factor expression induced by tumor necrosis factor- $\alpha$ ; or interleukin-1 $\beta$ ,” *Fertil. Steril.*, vol. 101, no. 2, p. 595–601.e1, 2014.
- [26] Stratton P. and Berkley K. J., “Chronic pelvic pain and endometriosis: translational evidence of the relationship and implications,” *Hum. Reprod. Update*, vol. 17, no. 3, pp. 327–346, 2011.
- [27] Czeglédi L. *et al.*, “Presence of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the plasma and milk of ruminant animals,” *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 172, no. 1, pp. 115–119, 2011.
- [28] Csanaky K., Doppler W., Tamás A., Kovács K., Tóth G., and Reglődi D., “Influence of Terminal Differentiation and PACAP on the Cytokine, Chemokine, and Growth Factor Secretion of Mammary Epithelial Cells,” *J. Mol. Neurosci.*, vol. 52, no. 1, pp. 28–36, 2014.
- [29] Koch Y., Werner H., and Fridkin M., “Hypothalamic hormones in milk,” *Endocr. Regul.*, vol. 25, no. 1–2, pp. 128–133, 1991.

## AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

Pohóczky Krisztina, Kun József, Szalontai Bálint, Szőke Éva, Sággy Éva, Payrits Maja, Kajtár Béla, Kovács Krisztina, Környei József László, Garai János, Garami András, Perkecz Anikó, Czeglédi Levente, Helyes Zsuzsanna (2016). Estrogen-dependent up-regulation of TRPA1 and TRPV1 receptor proteins in the rat endometrium. JOURNAL OF MOLECULAR ENDOCRINOLOGY, vol. 56 no. 2, pp.135-49. doi:10.1530/JME-15-0184 (IF: 2,947 Q1)

Bohonyi Noémi\*, Pohóczky Krisztina\*, Szalontai Bálint, Perkecz Anikó, Kovács Krisztina, Kajtár Béla, Orbán Lajos, Varga Tamás, Szegedi Sarolta, Bódis József, Helyes Zsuzsanna, Koppán Miklós (2017) Local upregulation of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) and Vanilloid 1 (TRPV1) ion channels in rectosigmoid deep infiltrating endometriosis. MOLECULAR PAIN (IF: 3,533 Q1; \*megosztott első szerzős eredeti közlemény)

Pohóczky Krisztina, Tamás Andrea, Reglődi Dóra, Bagoly Teréz, Helyes Zsuzsanna, Czeglédi Levente (2017) Examination of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide (PACAP) in the sheep udder and milk, and in the lamb plasma after suckling. LIVESTOCK SCIENCE (IF: 1,293 Q1; accepted, minor revision pending)

Összesített impact faktor: 6,48 (az első két, megjelent publikáció alapján)

## EGYÉB EREDETI KÖZLEMÉNYEK

Sághy Éva, Sipos Éva, Ács Péter, Bölscei Kata, Pohóczky Krisztina, Kemény Ágnes, Sándor Zoltán, Szőke Éva, Sétáló György, Komoly Sámuel, Pintér Erika (2016) TRPA1 deficiency is protective in cuprizone-induced demyelination-A new target against oligodendrocyte apoptosis. GLIA 64:(12) p: 2166-2180. DOI: 10.1002/glia.23051  
**IF: 5,997**

Kun József, Szitter István, Kemény Ágnes, Perkecz Anikó, Kereskai László, Pohóczky Krisztina, Vincze Áron, Godi S, Szabo István, Szolcsányi János, Pintér Erika, Helyes Zsuzsanna (2014) Upregulation of the transient receptor potential ankyrin 1 ion channel in the inflamed human and mouse colon and its protective roles. PLOS ONE 9:(9) Paper e108164. 15  
**IF: 3.534**

de Oliveira Cristiane, Garami Anadrás, Lehto Sonya G, Pakai Eszter, Tékus Valéria, Pohóczky Krisztina, Youngblood Beth D, Wang Weiya, Kort Michael E, Kym Philip R, Pintér Erika, Gavva Narendra R, Romanovsky Andrej A (2014) Transient receptor potential channel ankyrin-1 is not a cold sensor for autonomic thermoregulation in rodents. JOURNAL OF NEUROSCIENCE 34:(13) pp. 4445-4452. (2014)  
**IF: 6.908**

Gulyás Gabriella, Béri Béla, Jávor András, Márk László, Csősz Éva, Pohóczky Krisztina, Soltész Beáta, Kuti Dániel, Czeglédi Levente (2012) Holtein-Fríz tehének hosszú hasznos élettartamának vizsgálata proteomikai módszerekkel. Debreceni Egyetem Agrártudományi Közlemények, Acta Agraria Debreceniensis.

### **Könyvrészlet:**

Czeglédi Levente, Pohóczky Krisztina, Gulyás Gabriella, Soltész Beáta, Jávor András (2012) Proteome analysis of musculus longissimus dorsi of Hungarian Merino and Tsigai sheep breeds. In: P.: Rodrigues, Eckersall D. and Almeida A. (eds.), Farm Animal Proteomics. 1-208, Wageningen Academic Press, (ISBN: 978-90-8686-195-8). 123-126.

## **Az összes publikáció (teljes közlemények és kivonatok) kumulatív impakt faktora**

IF (citalható absztraktok nélkül): 22,919

Összes idézők száma MTMT: 26

Összes idézők száma Google Scholar: 56

Ebből független MTMT: 22

H-index: 3

## **KONGRESSZUSI SZÓBELI ELŐADÁSOK JEGYZÉKE**

**47. Membrán-transzport Konferencia** Sümeg, 2017. május 16-19. A Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1 és Vanilloid 1 ioncsatornák jelenléte, valamint ösztrogénkezelés hatására és endometriózisban történő expresszió-változásai kísérletes állatmodellekben és klinikai mintákban. Kovács Tibor díj átadásával egybekapcsolt előadás

**PTE Idegtudományi Centrum és Szentágothai János Kutatóközpont PhD és TDK konferencia** Pécs, 2014. november 13-14.

A Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1 és Ankyrin 1 ioncsatornák jelenléte és ösztrogén kezelés hatására történő expresszió-növekedése patkány endometriumban.

PhD/5 szekció: 1. helyezés

**II. Neuroendokrinológiai Szimpózium** Pécs, 2015. június 5.

A TRPA1 és TRPV1 receptor jelenléte, valamint ösztrogén kezelés hatására történő expresszió-növekedése patkány endometriumban.



## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőimnek, Helyes Zsuzsanna Professzor Asszonynak és Dr. Czeglédi Leventének szakmai irányításukat, valamint a rengeteg segítséget, amelyet PhD tanulmányaim során nyújtottak. Lelkesedésük, pozitív gondolkodásuk valamint a szakma iránti elkötelezettségük követendő példaként szolgált számomra.

Szeretnék köszönetet mondani Pintér Erika Professzor Asszonynak, a Gyógyszertudományok Doktori Iskola vezetőjének, tanácsaiért és a kutatómunkám során nyújtott segítségével. Köszönet illeti Szolcsányi János Professzor Urat, doktori iskolánk megalapítóját, aki szakmai elhivatottságával, segítőkészségével példát mutat mindannyiunk számára.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Szőke Évának, Dr. Bölcskei Katának és Dr. Poór Miklósnak, akik szakmai tanácsaikkal segítették munkámat. Köszönöm Reglődi Dóra Professzor Asszonynak, Dr. Tamás Andreának, Dr. Bohonyi Noéminek, Dr. Szalontai Bálintnak, Dr. Kun Józsefnek, Dr. Kajtár Bélának, Dr. Kovács Krisztinának, Dr. Környei Józsefnek, Dr. Garami Andrásnak és Dr. Garai Jánosnak, hogy segítséget nyújtottak a kéziratok megírása során.

Köszönöm PhD hallgató társaimnak, Dr. Sággy Évának, Dr. Csekő Katának, Payrits Majának, Bencze Noéminek és Dr. Aczél Tímeának, hogy mindennapjaimat egy vidám, pozitív környezetben tölthetem, és hogy számíthatok rájuk mind szakmai, mind pedig magánéleti kérdésekben. Köszönöm a kísérletek során nyújtott nélkülözhetetlen segítségét Disztl Cecíliának, Buzási Ádámné Annának, Perkecz Anikónak, Bagoly Teréznek és Önböli Gyuláné Dórának. Köszönettel tartozom kollaborátorainknak, a PTE ÁOK Anatómiai és Patológiai Intézetnek, A PTE KK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikának, a PTE ÁOK Transzlációs Medicina Intézetnek és a DE AGTC Állattenyésztési és Takarmányozási Intézetnek. Továbbá köszönöm a PTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiái Intézet minden tagjának, hogy én is részese lehetek egy ilyen nagyszerű, vidám csapatnak.

Végül, de nem utolsósorban hálás köszönettel tartozom szüleimnek, nagypapámnak és testvéreimnek, akik mindig támogattak és biztattak. Köszönöm továbbá férjemnek, Hartner Gergelynek a sok türelmet és támogatást, amely nélkül e dolgozat nem jöhetett volna létre.

A kutatás az Európai Unió és Magyarország támogatásával a GINOP-2.3.3.- 15-2016-00050 és GINOP-2.3.3.- 15-2016-00048 azonosító számú című projekt keretei között valósult meg.