

**A lipid raft diszrupció hatásának vizsgálata Tranziens Receptor
Potenciál ioncsatornák aktiválhatóságára**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés



dr. Horváth Ádám

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Neurofarmakológia Program

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

Témavezető: Dr. Szőke Éva

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Pécs

2022.

Tartalomjegyzék

1.	Rövidítések jegyzéke	4
2.	Kutatási koncepció	6
3.	Bevezetés, irodalmi áttekintés	7
3.1.	A fájdalomcsillapítás rövid története	7
3.2.	A fájdalom élettana	8
3.3.	A kapszaicin kutatás története	9
3.4.	A kapszaicin érzékeny idegvégződések működése	11
3.5.	A Tranziens Receptor Potenciál ioncsatornák	13
3.6.	A TRPV1 szerkezete és funkciója	15
3.7.	A TRPA1 szerkezete és funkciója	18
3.8.	A sejtmembrán szerkezete és a lipid raft modell.....	20
3.9.	A lipid raftok élettani és patológiai szerepe	21
3.10.	A lipid raftok farmakológiai vizsgálata.....	23
4.	Célkitűzések	25
5.	Kísérleti modellek és vizsgálati módszerek	26
5.1.	Fluoreszcencia spektroszkópia.....	26
5.1.1.	Membránpolaritás vizsgálata	27
5.1.2.	Membránfluiditás vizsgálata	27
5.2.	CAPS-kiváltotta akut kemonoczeptív reakció modell	31
5.3.	RTX-indukálta termális allodínia és mechanikai hiperalgécia modell ...	31
5.3.1.	Emelkedő hőmérsékletű forró lap (Hot Plate).....	32
5.3.2.	Dinamikus Plantaris Eszteziométer (DPA)	33
5.4.	Formalin-kiváltotta akut gyulladáshos fájdalom modell.....	34
5.5.	Anyagok.....	34
5.6.	Etikai vonatkozások	35
5.7.	Statisztikai analízis	35
6.	Eredmények	36
6.1.	A lipid raft diszrupció hatásának vizsgálata a sejtmembrán polarítására és fluidítására	36

6.1.1.	A SMáz és Myr hatása a membránpolarításra.....	36
6.1.2.	A lipid raft diszrupció hatása a membránfluiditásra.....	37
6.2.	Szfingolipid depléció hatásának vizsgálata a TRPV1 és TRPA1 ioncsatornák aktiválhatóságára <i>in vivo</i>	39
6.2.1.	A SMáz és Myr hatása a CAPS kiváltotta akut kemonociceptív reakcióra	39
6.2.2.	A SMáz és Myr hatása az RTX indukálta akut termális allodíniára és mechanikai hiperalégziára	41
6.2.3.	A SMáz és Myr hatása a formalin indukálta akut gyulladáson fájdalomra	45
6.3.	Koleszterin depléció hatásának vizsgálata a TRPV1 és TRPA1 ioncsatornák aktiválhatóságára <i>in vivo</i>	47
6.3.1.	Az MCD és a C1 hatása a CAPS kiváltotta akut kemonociceptív reakcióra	47
6.3.2.	Az MCD és a C1 hatása az RTX indukálta akut termális allodíniára és mechanikai hiperalégziára	49
6.3.3.	Az MCD és a C1 hatása a formalin indukálta akut gyulladáson fájdalomra	53
7.	Megbeszélés, következtetések.....	55
8.	Új eredmények összefoglalása	61
9.	Irodalmi hivatkozások	63
10.	Publikációs jegyzék	89
10.1.	Az értekezés alapját képező publikációk.....	89
10.2.	Egyéb eredeti közlemények	90
10.3.	Kongresszusi poszter prezentációk.....	91
10.4.	Kongresszusi szóbeli prezentációk.....	94
11.	Köszönetnyilvánítás	96

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AMPA: 2-amino-3-metil-(3-hidroxi-5-metil-izoxazol-1-il)-propionsav

ANOVA: variancia-analízis/analysis of variance

ARD: ismétlődő ankirin domén/ankyrin repeated domain

ATP: adenzin-trifoszfát

C1: carboxamido-szteroid

CaM: kalmodulin

CAPS: kapszaicin

CFA: komplett Freund-adjuváns

CGRP: kalcitonin-gén-rokon-peptid/calcitonin gene related peptide

CHO: kínai hörcsög ovárium/chinese hamster ovary

CoG: Center of Gravity

CRAC: koleszterin kötő domén/cholesterol recognition amino-acid consensus

DMSO: dimetil-szulfoxid

DRG: hátsógyöki ganglion/dorsal root ganglion

DPA: Dinamikus Plantaris Eszteziométer

ECS: extracelluláris oldat/extracellular solution

GABA: γ -amino-vajsav

Gag: csoportspecifikus antigén/group-specific antigen

GP: általánosított polarizáció/generalized polarization

GPI: glikozil-foszfatidil-inozitol

HEK293: humán embrionális vese 293/human embryonic kidney 293

Laurdan: 6-dodekanoil-N,N-dimetil-naftilamin

MCD: metil- β -ciklodextrin

Myr: myriocin

NSAID: nem-szteroid gyulladásgátlók/non-steroidal anti-inflammatory drugs

NGF: idegi eredetű növekedési faktor/nerve growth factor

PBS: foszfát pufferelt fiziológiás sóoldat/phosphate buffered saline

PIP2: foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát

PGE2: prosztaglandin E2

PKA: protein kináz A
PKC: protein kináz C
RAMEB: random-metilál- β -ciklodextrin
RTX: reziniferatoxin
Rv: rezolvin
SEM: standard hiba/standard error of mean
SMáz: szfingomielináz
 τ_{rot} : rotációs élettartam
TCM: Tradicionális Kínai Orvoslás/Traditional Chinese Medicine
TM: transzmembrán
TG: trigeminális ganglion
TRP: Tranziens Receptor Potenciál
TRPA1: Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1
TRPC1: Tranziens Receptor Potenciál Canonical 1
TRPC3: Tranziens Receptor Potenciál Canonical 3
TRPC5: Tranziens Receptor Potenciál Canonical 5
TRPM8: Tranziens Receptor Potenciál Melastatin 8
TRPV1: Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1

2. KUTATÁSI KONCEPCIÓ

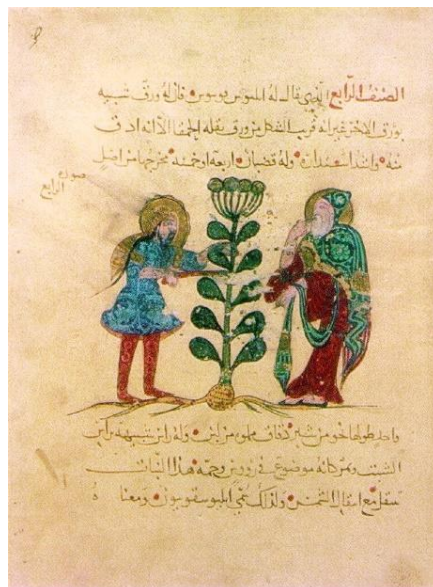
A fájdalom csillapítása és a fájdalomcsillapító gyógyszerek felfedezése mind a mai napig igen fontos területe az orvosi biológiai kutatásoknak, hiszen a modern kor egyik legjelentősebb gazdasági és egészségügyi problémáját jelenti a központi és/vagy perifériás idegrendszer diszfunkcióján alapuló neuropátiás fájdalom. Ennek a kórállapotnak a kezelése nagy kihívást jelent, hiszen a klasszikus gyógyszeres terápia, mint a nem-szteroid gyulladáscsökkentők (NSAID) – leggyakrabban pl. diklofenák, ibuprofen -, illetve opioidok – pl. a gyenge opioid hatású tramadol, vagy az erősebb morfin, illetve fentanil – nem rendelkeznek kielégítő terápiás hatással és/vagy nem alkalmazhatóak hosszú távon a mellékhatások (pl. NSAID kiváltotta gyomorfekély, opioid dependencia) miatt. A ma elfogadott terápiás protokollok éppen ezért egyéb indikációban alkalmazott gyógyszerekkel – úgynevezett adjuváns analgetikumok (pl. antiepileptikumok, antidepresszánsok) - próbálják enyhíteni a betegek fájdalmát, azonban számos esetben ezekkel sem érhető el megfelelő terápiás hatás (Botz és mtsai., 2017).

Éppen ezért van szükség új terápiás megközelítések kutatására, amelyek eltérnek a klasszikus farmakológiai receptor-antagonizmustól, hiszen a neuropátiás fájdalom kialakulásában nagy szerepet játszó Tranziens Receptor Potenciál (TRP) ioncsatornák esetében ezek közül több próbálkozás is elbukott az elmúlt évtizedekben (Helyes és mtsai., 2003; Lee és mtsai., 2015). Kutatócsoportunk új megközelítése a kapszaicin-érzékeny érzőidegvégződéseken megtalálható TRP Vanilloid 1 (TRPV1) és TRP Ankyrin 1 (TRPA1) receptorok aktivációs mechanizmusainak alternatív befolyásolásán alapul, amelynek lényege a sejtmembránok mikrodoménjeinek – úgynevezett lipid raftok – és TRP fehérjék közötti hidrofób kapcsolatok megbontása.

3. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A fájdalomcsillapítás rövid története

A fájdalom talán az egyik legmeghatározóbb és legnehezebben megfogalmazható emberi érzet, így nem meglepő, hogy annak csillapítása már az idők kezdete óta foglalkoztatja az emberiséget. Az „*International Association for the Study of Pain*” legújabb definíciója szerint „egy kellemetlen szenzoros és emocionális élmény, amely tényleges vagy potenciális szövetségsodással kapcsolatos, vagy ahhoz hasonlít”. A fájdalomcsillapítás történetét dokumentáló emlékek egészen az ókorig nyúlnak vissza, és az egyik leghíresebb ezek közül az egyiptomi *Ebers Papyrus*, amelyben számtalan korabeli betegség, gyógymód, valamint számos a gyógyítást átjáró vallási elem leírása található meg. Több ókori feljegyzés és gyűjtemény származik például a Távols-Keletről, amelyekben a korabeli Tradicionális Kínai Orvoslás (TCM) alapjairól (pl. Jin és Jang elmélet) valamint a módszereiről (pl. köpölyözés, akupunktúra) nyerhetünk információkat, azonban megjegyzendő, hogy a TCM egyes tanai és módszerei a mai alternatív medicina gyakorlatának szerves részét képezik. A XIV. században készült *Codex Ayasofya* (1. ábra) összefoglalta a kor orvosi ismereteit, gyógynövényekkel kapcsolatos információkat és a gyógyítás során alkalmazott anyagokat.



1. ábra Részlet a *Codex Ayasofya*-ból (Szállási és Blumberg, 1999)

A következő nagy lépést Friedrich Sertürner munkája jelentette, aki 1817-ben elsőként izolálta a mákból (*Papaver somniferum*) származó ópiumból a morfiomot, amely később teret nyitott a ma is használatos major analgetikumok fejlesztésének (Sertuerner, 1817). Szintén még a XIX. században történt újabb felfedezések indították útjára az NSAID-ok fejlesztését, hiszen 1897-ben Felix Hoffmann a Bayer gyógyszergyár munkatársa kémiai szintézis útján előállította az acetilszalicilsavat. Ezt az áttörést követte a további NSAID-ok fejlesztése az 1950-es évektől kezdődően (Goodman és mtsai., 1996). Manapság számos új hatásmechanizmusú gyógyszerjelölt fejlesztése zajlik, amelyek egy része a klasszikus farmakológiai megfontolásokat követi, azonban egyre inkább teret nyernek a fájdalomérzet kialakulásában szerepet játszó receptorok és érzőideg-végződés alternatív befolyásolási lehetőségei is.

3.2. A fájdalom élettana

A szövetek épségét, mechanikai, kémiai és termikus ingerek károsíthatják, amelyek a specializált magas ingerküszöbű szabad idegvégződéseket, az úgynevezett nociceptorokat aktiválják. Ez az elnevezés Sherringtontól származik és a latin *nocere* (ártani, károsítani) igéből eredeztethető. A nociceptorok megtalálhatóak a bőrben, bőr alatti szövetekben, csontokban, izmokban, fogbélben, savós hártyákban, illetve számos egyéb helyen a szervezetben. Érzékenységük alapján megkülönböztetünk egyfajta ingerrel aktiválható (unimodális) és többfajta ingerrel aktiválható (polimodális) nociceptorokat. Mielinizáltság alapján pedig megkülönböztetjük az A δ , illetve C-rostokat. Előbbiek vékony velőshüvellyel rendelkeznek és lassan vezető (átlagosan kb. 15 m/s) rostok, amelyek végződéseit leginkább intenzív (fájdalmas) mechanikai behatások és forró hőmérséklet aktiválja. Utóbbiak pedig vékony, mielinhüvellyel nem rendelkező még lassabban (átlagosan 1 m/s) vezető rostok. A C-rostok egyik szubpopulációját alkotják a polimodális nociceptorok, amelyek mindhárom ingertípussal aktiválhatóak, és egy részükben proinflammatorikus neuropeptidok termelődnek, mint pl. a P anyag (Substance P), vagy a kalcitonin gén rokon peptid (CGRP), amelyek aktivációt követően szabadulnak fel az idegvégződésből és okoznak lokálisan úgynevezett neurogén gyulladást.

Az aktivált nociceptorokból származó ingerület az elsőrendű fájdalomrostok révén jut be a hátsó gyöki ganglionokba (Dorsal Root Ganglia – DRG) (I. neuron). Innen a centrális nyúlványok belépnek a gerincvelő szürkeállományába, ahol egy részük átkapcsolódik projekciós neuronokra (II. neuron) és a *lateralis tractus spinothalamicus*-ban a *thalamus*-ig szállítja az ingerületet, ahonnan a III. neuronra történő átkapcsolódás után a *thalamocorticalis* idegi kapcsolatok révén a fájdalomérzet a kéregben tudatosul (Gyires Klára és Fürst Zsuzsanna, 2011; Fonyó Attila és Kollai Márk, 2014).

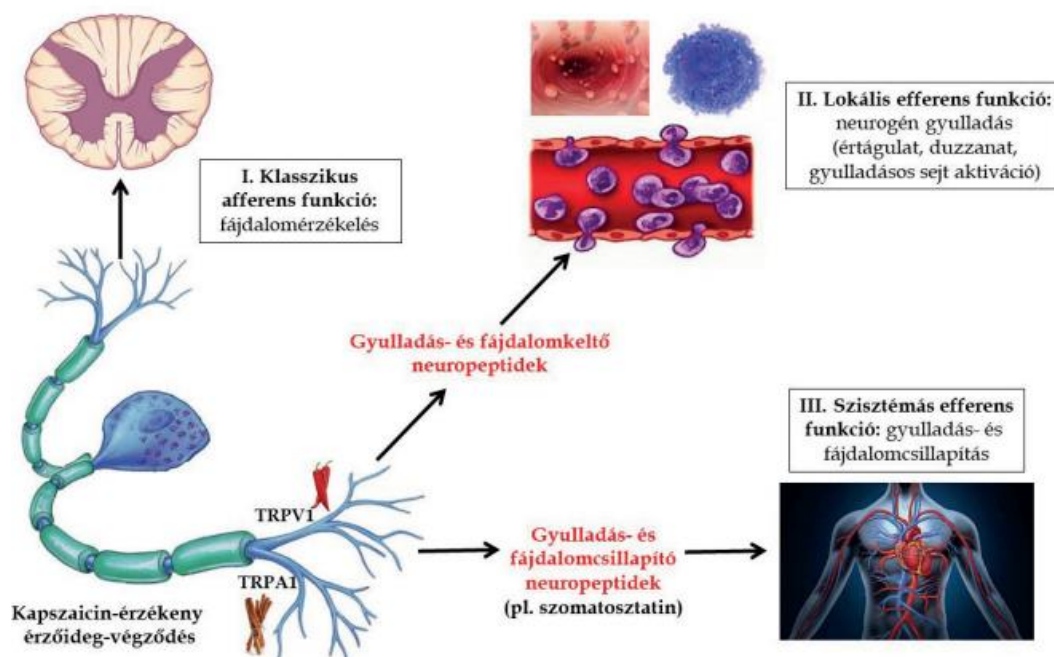
3.3. A kapszaicin kutatás története

A *Capsicum* fajokból készült alkoholos kivonatok már évszázadok óta szerves részét képezik az etnomedicina gyógyszerkincsének, hiszen tapasztalati úton megszerzett információk alapján étvágyjavító, bőrvörösítő és fájdalomcsillapító hatással rendelkeznek és mindmáig használatosak a magisztrális gyógyszerkészítésben, mint a VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben hivatalos alapanyag (*Capsici tinctura normata Ph. Hg. VIII.*). A csípős hatásért felelős vegyületek keverékét az úgynevezett kapszacinoidokat Christian Friedrich Bucholz izolálta először és a keveréket az izolált genusról nevezte el kapszicinnak (Bucholz, 1816). Később John Clough Thresh 1876-ban izolálta a majdnem tiszta kapszaicint (CAPS) (Thresh, 1876), végül azonban ez Karl Micko-nak sikerült 1898-ban (Micko, 1898, 1899). A CAPS kémiájában a következő lépés a szerkezet meghatározása volt, amelyet Nelson írt le 1919-ben (Nelson, 1919), majd 1930-ban Ernst Späth és Stephen F. Darling elvégezte a vegyület szintetikus előállítását (Späth és Darling, 1930). Mindeközben Hőgyes Endre 1878-ban igazolta, hogy a részleges tisztaságú CAPS kivonat viszonylag szelektíven képes aktiválni a szenzoros idegvégződéseket (Hőgyes, 1878). A CAPS-nel kapcsolatos farmakológiai kutatások Hőgyes megfigyelését követően háttérbe szorultak a XIX-XX. század vegetatív idegrendszerre ható szerekkel kapcsolatos kutatásai miatt, így csak mintegy bő hetven évvel később Jancsó Miklós foglalkozott újra a CAPS-nel és írta le, hogy nagyobb dózisokat alkalmazva tartós deszenzitizáció váltható ki kémiai irritánsokkal szemben (Jancsó, 1955).

10 évvel később Jancsó Miklós halálát követően felesége Jancsó-Gábor Aranka és közvetlen munkatársa Szolcsányi János közölte azokat az eredményeket, amelyben leírták, hogy ortodrómos-, vagy antidrómos ingerlést követő plazma protein extravazáció gátolható idegi denervációval, illetve CAPS deszenzitizációval. A kísérletek eredményeiből azt a következtetést vonták le, hogy a gyulladáskeltő anyagok kapszaicin-szenzitív érzőidegvégződésekből szabadulnak fel (Jancsó és mtsai., 1967, 1968). További kísérletekben mintegy 40 szintetikus CAPS analógot vizsgáltak, azonban nem találtak olyan vegyületet, amely előzetes deszenzitizáció nélkül tudta volna gátolni a fájdalomkeltő hatását a különböző kémiai irritánsoknak. Bár a hipotézis nem igazolódott, azonban ekkor vetődött fel először egy specifikus CAPS receptor létezésének az ötlete, amelynek sematikus szerkezetéről két cikkben számoltak be (Szolcsányi és Jancsó-Gábor, 1975, 1976). A következő néhány évtizedben sorra jelentek meg a közlemények a CAPS-nel kapcsolatban, amelyekben leírták, hogy nem-kolinerg nem-adrenerg mechanizmusok játszanak szerepet a hatásban, valamint megalkották a kapszaicin-szenzitív idegrendszer fogalmát, amely elmélet igazolást nyert a gyulladáskeltő neuropeptidekkel – pl. CGRP, P anyag - kapcsolatban (Szolcsányi és Barthó, 1978, 1979; Szolcsányi és Barthó, 1982; Szolcsányi, 1983; Holzer, 1988; Maggi és Meli, 1988; Szolcsányi, 1987; Maggi, 1995). Újabb fejezetet nyitott meg az első CAPS antagonistáknak szintézise (Bevan és mtsai., 1992), illetve egy másik vanilloid szerkezetű anyag, a reziniferatoxin (RTX) hatásának vizsgálata (Bevan és Szolcsányi, 1990; Szallasi és Blumberg, 1990). Ekkoriban azt feltételezték, hogy két vanilloid receptor létezik, azonban Michael Jerry Caterina és munkatársai 1997-ben klónozták a CAPS receptort (Caterina és mtsai., 1997), amelyet először Vanilloid 1 receptornak neveztek el, majd később a szerkezet alapján a TRP ioncsatorna családba, azon belül a Vanilloid alcsaládba sorolták, mint első tagot és így kapta a TRPV1 nevet (Gunthorpe és mtsai., 2002).

3.4. A kapszaicin érzékeny idegvégződések működése

A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződések hármassal rendelkező funkcióval rendelkeznek. Az első fontos funkció, hogy aktiválódásakor a klasszikus afferens mechanizmus révén a képződött ingerület eljut a központi idegrendszerbe, ahol kialakul a nocicepció. A második funkció egy lokális efferens hatás, az aktiváció intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedést eredményez, ami a tárolt peptidmediátorok (CGRP, P anyag) felszabadulásához vezet, amelyek pedig plazma protein extravazációval, vazodilatációval, gyulladásos sejtek aktivációjával váltanak ki neurogén gyulladást a beidegzett területen. A harmadik, egy szisztémás efferens funkció, az aktiváció után az idegvégződésekől ugyanis szوماتosztatin is felszabadul, ami a szisztémás keringésbe jutva a test távolabbi pontjain is szisztémás gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatást fejt ki. Az érzőideg-végződések e hármassal funkcióját – amelyet a 2. ábra szemléltet - szenzokrin működésként definiálták (Szolcsányi és mtsai., 2004).

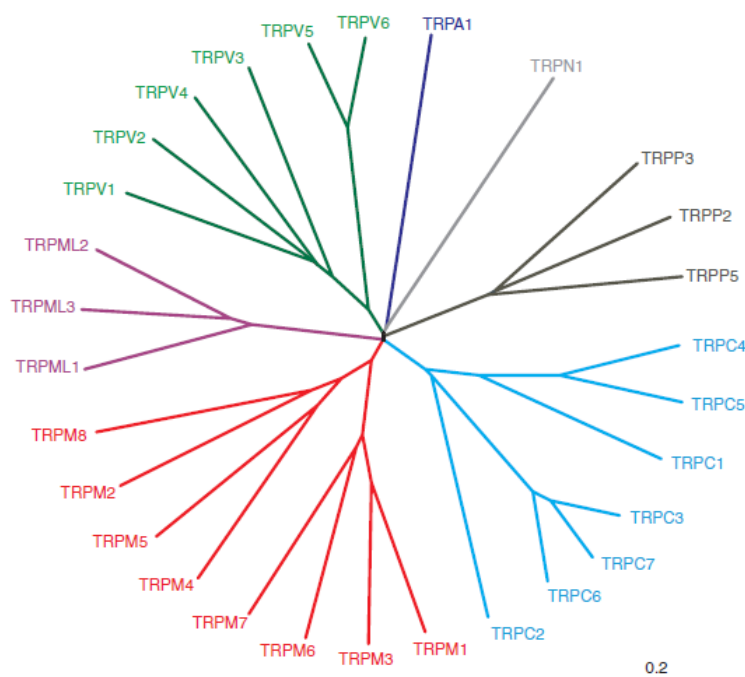


2. ábra A kapszaicin-érzékeny érző idegvégződés hármassal funkciója (1. klasszikus afferens funkció, 2. lokális efferens funkció, 3. szisztémás efferens funkció) (Helyes és mtsai., 2018)

A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződések hármaskörű funkciójának első kísérletes bizonyítékait Szolcsányi János és Pintér Erika megfigyelései szolgáltatták, amelyben leírták, hogy gerincvelői hátsó gyökök (lumbális 4-6) átmetszése után a perifériás csont egyoldali antidrómos ingerlését követő, Evans késsel jelzett – lézer Doppler készülékkel mért - plazma protein extravazáció és neurogén gyulladás a másik gyökér ingerlését követően kisebb mértékű volt, valamint ez a jelenség gátlható volt CAPS-nel történő előkezeléssel is (Pintér és Szolcsányi, 1988; Pintér és Szolcsányi, 1996). Az ellenoldali gyulladásos válasz csökkenését a korábbról már ismert szomatosztatinnak tulajdonították, és ezt a feltételezést később számos kísérleti elrendezésben igazolni tudták (Helyes és mtsai., 2004; Pintér és mtsai., 2006; Helyes és mtsai., 2009; Szolcsányi és mtsai., 2011) és megalkották a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződések hármaskörű funkciójának elméletét.

3.5.A Tranziens Receptor Potenciál ioncsatornák

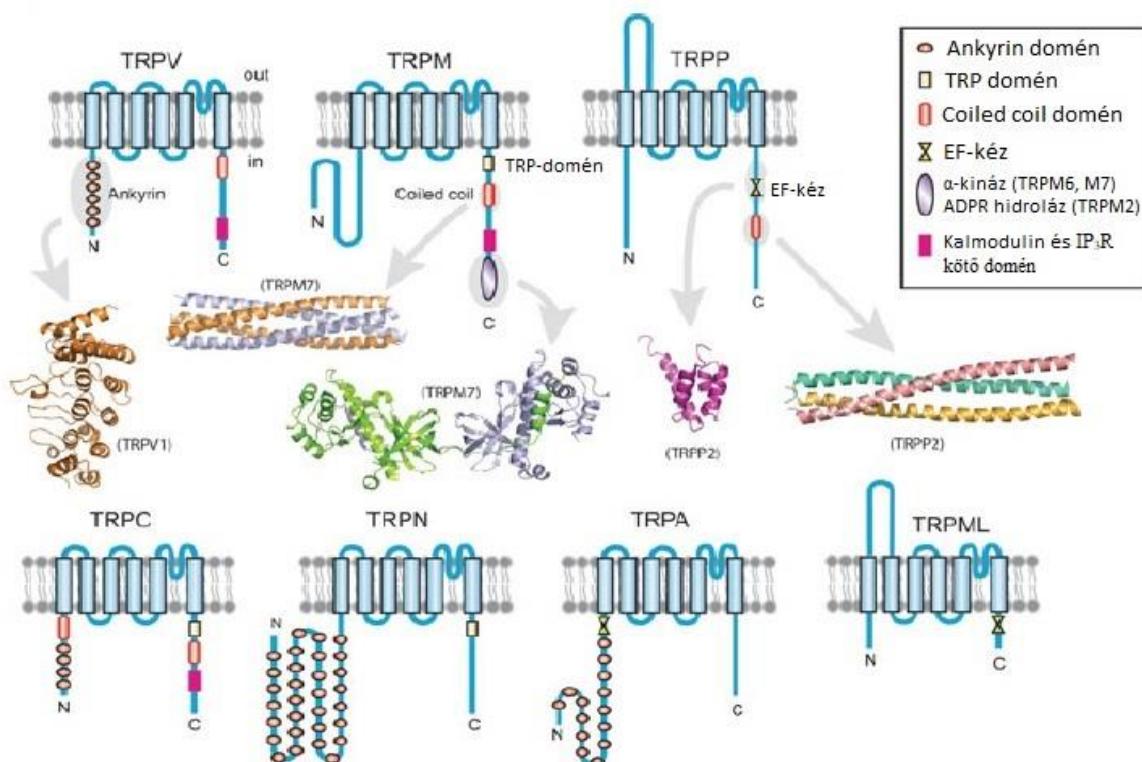
A TRP fehérjék alkotják az egyik legnagyobb ioncsatorna családot, amelynek eddig emlősökben 28 tagját (emberben 27) azonosították. Az ide tartozó kation csatornákat hét alcsaládba lehet besorolni a szerkezeti-, és szekvencia-homológia alapján (Nilius és Owsianik, 2011): TRPC (“Canonical”), TRPV (“Vanilloid”), TRPM (“Melastatin”), TRPP (“Polycystin”), TRPML (“MucoLipin”), TRPA (“Ankyrin”), és TRPN (“NO-Mechano-Potential C”) (3. ábra)



3. ábra A TRP receptorcsalád eddig felfedezett tagjai (Nilius és Owsianik, 2011)

Cosens és Manning 1969-ben írta le, hogy *Drosophila melanogaster* egy mutáns törzsében a fotoreceptorok tranziens aktivitást mutatnak, majd később az elektroretinográfiás vizsgálatok alapján nevezték el ezeket a fotoreceptorokat TRP csatornáknak (Cosens és Manning, 1969; Minke és mtsai., 1975). Ezt követően felfedezték, hogy a kérdéses receptor a TRPL alcsaládba tartozik (Phillips és mtsai., 1992). Később Michael Jerry Caterina és munkatársai klónozták és karakterizálták a TRPV1 receptort (Caterina és mtsai., 1997). A TRP család tagjai többnyire nem-szelektív kationcsatornák, azonban bizonyos altípusok kiemelt szelektivitást mutatnak főként Ca^{2+} , kisebb részben Mg^{2+} ionok iránt.

Az ioncsatornák hat transzmembrán (TM) doménnel rendelkeznek (S1-S6), általában funkcionális tetramer formában képeznek működési egységet, és az ionok számára átjárható pórus az ötödik és a hatodik domén közötti hurok régióban található. A membránfehérjék N-, illetve a C-terminális végződése intracellulárisan helyezkedik el, melyeken jellegzetes funkciójú, jól ismert molekuláris struktúrák találhatóak meg. Ide sorolandó többek között az ismétlődő ankirin domén (Ankyrin Repeated Domain, ARD), a TRP domén, az EF-kéz struktúrák, illetve egyéb jellemző képletek (Nilius és Owsianik, 2011) (4. ábra).

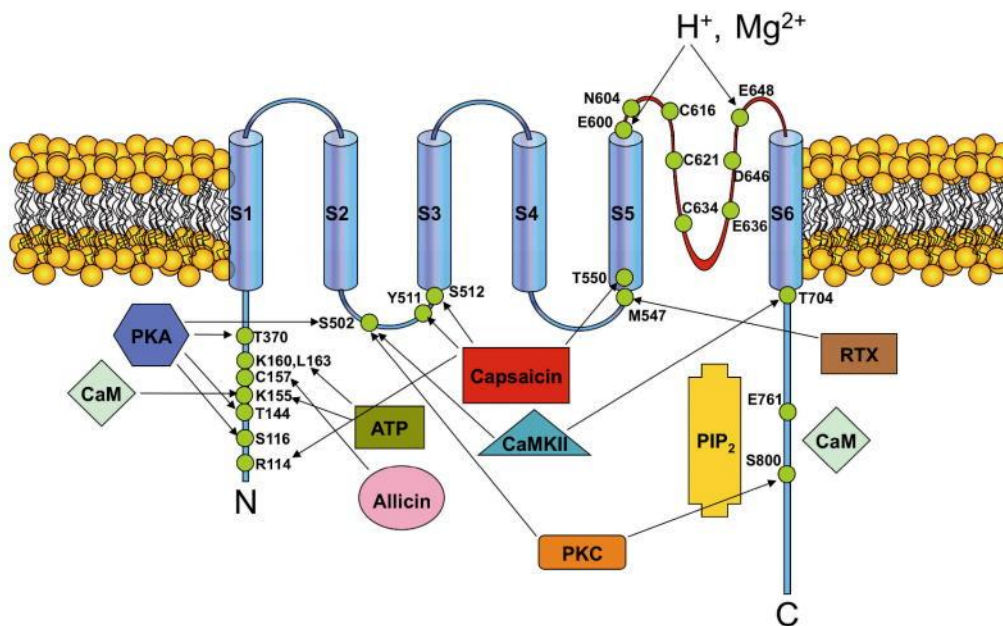


4. ábra Az egyes TRP receptor alcsoportok általános szerkezete Li, Yu, és Yang 2011 alapján

A különböző TRP csatornáknak kiemelt szerepük van számos élettani és patológiai folyamatban egyaránt (Nilius és Owsianik, 2011; Gees és mtsai., 2012; Nilius és Szállási, 2014). Azokat a kórállapotokat, amelyekben bizonyított egy-egy ioncsatorna szerepe gyakran nevezik az angol nomenklatúrában „*channelopathy*”-nak. A TRP csatornáknak szerepük van többek között a krónikus obstruktív tüdőbetegség, psoriasis, arthritis, gyulladásoos bélbetegségek és számos egyéb betegség kialakulásában (Moran és mtsai., 2011; Nilius és Szállási, 2014; Kaneko és Szállási, 2014).

3.6. A TRPV1 szerkezete és funkciója

A CAPS receptor néven is ismert fehérje a TRP család többi tagjához hasonlóan hat TM régióval rendelkezik, az ionok számára átjárható pórus az S5 és S6 szegmens között formálódik, melyhez kapcsolódik az S1-4 TM szakasz. Megtalálható benne a 23-25 aminosavból álló TRP domén, mely az S6 TM régió után helyezkedik el. Intracellulárisan található az N- és C-terminális vége is, illetve az N-terminális fontos részét képezi az alszaládra jellemző hatelemű ARD, amelynek funkcionális szerepe is van. A TRPV1 szerkezetét és a funkcionális működés szempontjából kiemelt aminosav pozíciókat az 5. ábra szemlélteti.



5. ábra A TRPV1 receptor szerkezete. A funkcióját befolyásoló jellegzetes anyagok kötődési helyeit a zöld körök szemléltetik (Jara-Oseguera és mtsai., 2008). ATP: adozin-trifoszfát, CaM: kalmodulin, CaMKII: kalmodulin-dependens protein kináz II, PIP₂: foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát, PKA: protein kináz A, PKC: protein kináz C, RTX: reziniferatoxin

A TRPV1 elsősorban a primer szenzoros neuronokon expresszálódik, de megtalálható számos extraneuronális szövetben is, mint pl. a keratinocitákban, hízósejtekben és a gasztrointesztinális rendszerben (Nilius és Owsianik, 2011). A TRPV1 receptor működését számos endogén és exogén anyag szabályozza. Az exogén agonistái közül a legfontosabbak a vanilloid szerkezeti elemet tartalmazó molekulák - a CAPS illetve a RTX (Szállasi és Blumberg, 1999, 1990) – amelyek az S3 és S4 transzmembrán régiók közötti úgynevezett „vanilloid-zsebbe” (S505-T550) kötődnek (Papakosta és mtsai., 2011). További fontos aminosavak a CAPS szempontjából a T511, S512 és W549, az RTX szempontjából pedig az M547 (Chou és mtsai., 2004). Egy másik növény családból, az *Allium* fajok közé tartozó fokhagymából származó allicin is aktiválja a TRPV1-et az N-terminális C157-es pozícióján keresztül (Macpherson és mtsai., 2005; Jara-Oseguera és mtsai., 2008). A növényi csipős anyagokon kívül számos állati toxin (pl. skorpiók és pókok mérgei) is TRPV1 aktivációt vált ki (Siemens és mtsai., 2006; Min és mtsai., 2013).

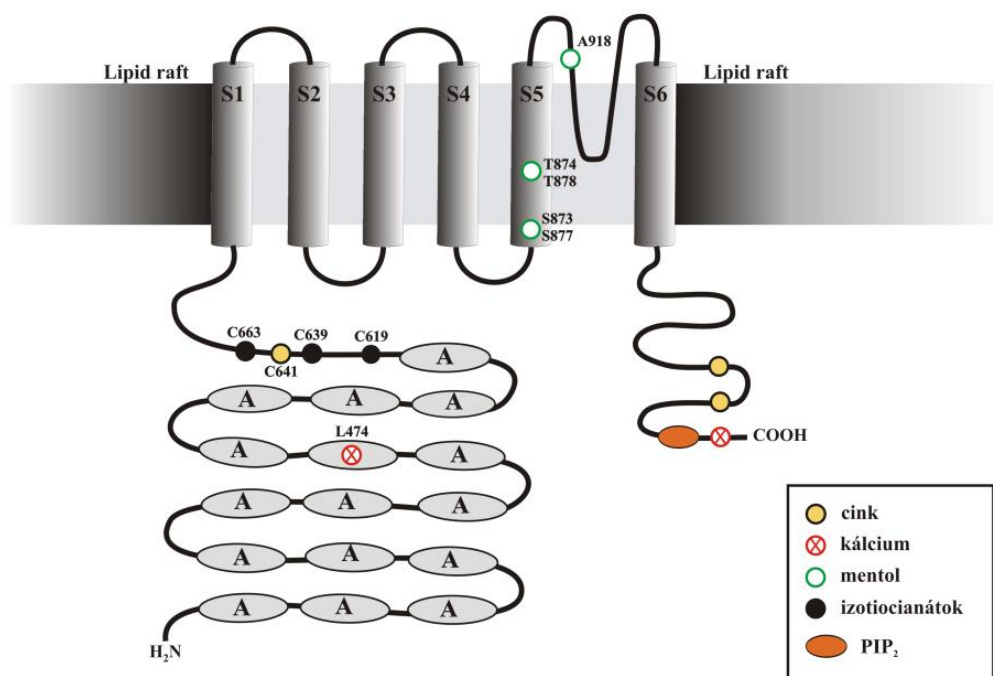
Az exogén vegyületeken túl számos endogén anyag, illetve fizikokémiai változás is képes aktiválni a csatornát. Az endokannabinoidok közé tartozó anandamid, N-arachidonil-dopamin valamint a nem kannabinoid N-oleoildopamin aktiválják a receptort (Zygmunt és mtsai., 1999; Smart és mtsai., 2000; Chu és mtsai., 2003), akárcsak az arachidonsav és egyéb zsírsav metabolitok (Hwang és mtsai., 2000). A fizikokémiai paraméterek közül az egyik legfontosabb a magas hőmérséklet (>43 °C), illetve az alacsony pH (<6) (Caterina és mtsai., 1997; Tominaga és mtsai., 1998; Nilius, 2007). Mindkét paraméter változása az S5-S6 pórusformáló TM régió extracelluláris részén aktiválja a receptort. A hőmérséklet érzékelésében a kritikus aminosavak az N628, N652 és Y653, míg a protonok érzékelésében az E600 és E648 vesz részt (Welch és mtsai., 2000; Jordt és mtsai., 2000; Szolcsányi és Sándor, 2012; Winter és mtsai., 2013).

Az agonistákon túl fontos szerep jut a TRPV1 antagonistáknak is, amelyek közül említésre méltó a ruténium vörös, amely nem specifikus gátlószer, a *Tetradium daniellii*-ből izolált pellitorin, valamint a specifikus gátló – a CAPS szerkezet alapján szintetizált – kapszazepin (Maggi és mtsai., 1988; Bevan és mtsai., 1992; Oláh és mtsai., 2017). További fontos antagonista hatással rendelkező anyagok az endogénean megtalálható lipid mediátorok a rezolvinok (Rv) (Xu és mtsai., 2010; Park és mtsai., 2011; Morales-Lázaro és mtsai., 2013).

Említést kell tenni azokról az vegyületekről is - pl. foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát (PIP2), kalmodulin (CaM) és az adenzin triszfoszfát (ATP) –, amelyek a TRPV1 szenzitizációjában és deszenzitizációjában játszanak fontos szerepet (Winter és mtsai., 2013). A PIP2 több kötődési hellyel is rendelkezik a TRPV1 receptoron, egy az N-terminális régióban (F189-V221), kettő pedig a C-terminálison (K688-K718 és L777-S820) található (Grycova és mtsai., 2012). A funkcióját tekintve eltérő feltételezések vannak, hiszen egyes kutatócsoportok leírták, hogy deszenzitizálja a csatornát (Prescott és Julius, 2003), míg mások eredményei alapján védi a csatornát a tachifilaxis kialakulásától (Lishko és mtsai., 2007). A CaM szintén képes kötődni a receptor N- és C-terminálisához is, előbbi esetben Ca^{2+} jelenléte szükséges a kötődéshez (Rosenbaum és mtsai., 2004), míg utóbbi esetében nem (Numazaki és mtsai., 2003). A CaM kötőhelyei (F189-V221 és L777-S820) átlapolódnak a PIP2 kötőhelyeivel, így feltételezhetően kompetíció alakul ki közöttük és a CaM hatására a kalcium-kalmodulin-dependens protein kináz II által defoszforiláció következik be, ami deszenzitizálja a TRPV1-et (Jung és mtsai., 2004). Az ATP kötőhelye szintén átlapolódik a CaM és PIP2 kötőhelyekkel az N-terminálison, a kritikus aminosavak az R115, K155, K160, L163, Y199, Q202 és E210. Funkcióját tekintve az ATP direkt védi a csatornát a tachifilaxistól, illetve indirekt módon hat a PIP2 regenerációra (Lishko és mtsai., 2007). Ezeken kívül egyéb foszforilációs mechanizmusoknak – a protein kináz A (PKA) és protein kináz C (PKC), az idegi eredetű növekedési faktor (Nerve Growth Factor - NGF) - a tirozin kináz A receptor által közvetített módon – is fontos szerepet játszanak a TRPV1 szenzitizációjában (Premkumar és Ahern, 2000; Vellani és mtsai., 2001; Mohapatra és Nau, 2003, 2005; Szolcsányi és Sándor, 2012).

3.7. A TRPA1 szerkezete és funkciója

A TRPA1 receptor elsősorban a DRG-ben és a trigeminális ganglionban (TG) fordul elő (Story és mtsai., 2003), de megtalálható extraneuronálisan is a keratinocitákban (Atoyán és mtsai., 2009), illetve az enterokromaffin sejteken (Nozawa és mtsai., 2009). A TRPA1 és TRPV1 kb. 30 %-ban ko-expresszálódik a kapszaicin-szenzitív szenzoros idegekben és elsősorban a fájdalom érzékelésében van szerepe (Salas és mtsai., 2009). A receptor szerkezetével és a funkciót befolyásoló vegyületekkel kapcsolatos kutatásokban nagy kihívást jelentenek, ugyanis a TRPA1 szerkezete fajoként bizonyos mértékben eltérő (Chen és Kym, 2009). A legfontosabb szerkezeti elemeket és a funkció szempontjából kritikus aminosavakat a 6. ábra szemlélteti.



6. ábra A TRPA1 receptor szerkezete a funkciót befolyásoló anyagok kötődési helyeinek megjelölésével Laing és Dhaka 2016 alapján. A: ismétlődő ankirin domén, PIP₂: foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát

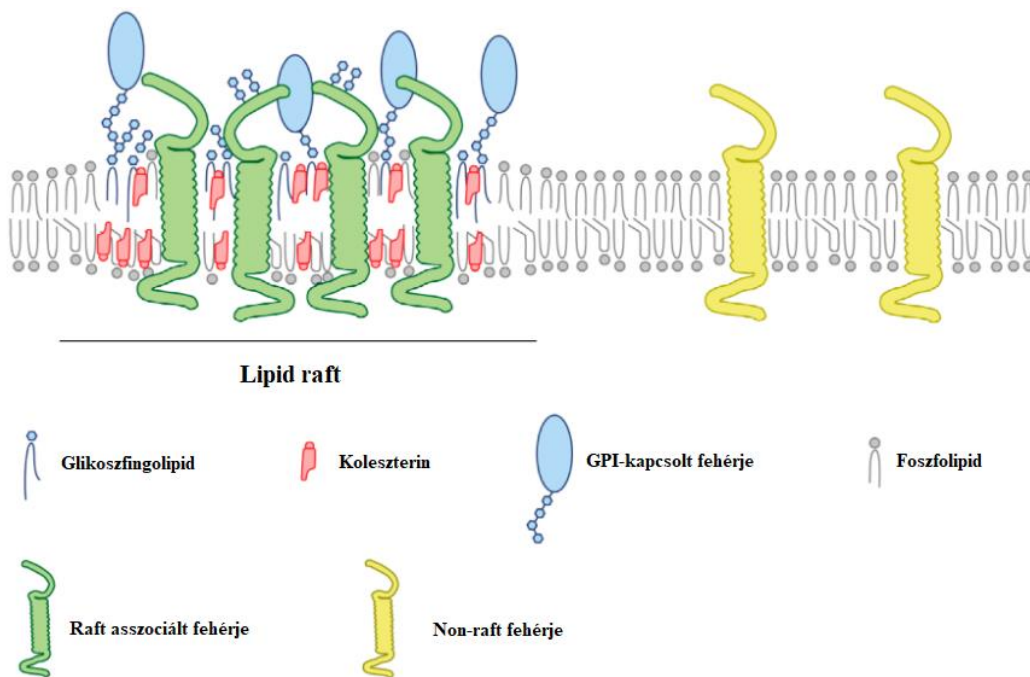
Jellegzetes szerkezeti elem a 14-18 elemből álló ARD, amely több, a csatorna aktiváció szempontjából fontos kötődési helyet biztosít (Julius, 2013). Az agonista hatású vegyületek általában elektrofil tulajdonságúak, amelyek kovalensen kapcsolódnak a megfelelő cisztein és lizin aminosavakhoz az N-terminálison (Hinman és mtsai., 2006; Macpherson és mtsai., 2007). A TRPV1-hez hasonlóan exogén és endogén ligandok is képesek aktiválni a TRPA1-et, az exogén agonisták jelentős része kémiai irritáns, pl. az allil-izotiocianát, a formaldehid, az allicin, a fahéjaldehid és a mentol (Béssell és mtsai., 2004; Jordt és mtsai., 2004; Macpherson és mtsai., 2005; McNamara és mtsai., 2007; Bautista és mtsai., 2013). Az endogén agonisták közül számos vegyület gyulladásos folyamatok eredményeképpen képződik, pl. a metilglioxál, hidrogén-peroxid vagy a 4-hidroxi-nonenal (Trevisani és mtsai., 2007; Eberhardt és mtsai., 2012). Ezekben a ligandumokon kívül TRPA1 aktivációt vált ki az alacsony hőmérséklet (<17 °C), valamint mechanikai ingerek is, amely alapján mechanoszenzitív receptornak is szokták nevezni a TRPA1-et (McKemy és mtsai., 2002; Peier és mtsai., 2002; Reid és Flonta, 2002; Story és mtsai., 2003; Vilceanu és Stucky, 2010).

Az antagonisták hatású vegyületek közül említést kell tenni a HC-030031-ről, amely gátolja a termális és mechanikai hiperalgészia kialakulását komplett Freund-adjuváns (CFA) adását követően (da Costa és mtsai., 2010). További fontos antagonisták hatású vegyület az SZV-1287, amely egy komplex hatásmechanizmusú, TRPA1/TRPV1 antagonisták és szemikarbazid-szenzitív amin-oxidáz hatással rendelkező anyag (Payrits és mtsai., 2016; Horváth és mtsai., 2018). További fontos szerep jut a TRPA1 esetében is a foszforilációs és defoszforilációs mechanizmusoknak is, amelyek hatással vannak a csatorna aktiválhatóságára. Ilyen folyamatokban játszik szerepet a kalcium, a PKA, a PIP2, a bradikinin és ATP (foszfolipáz C mediálta útvonalon) (Doerner és mtsai., 2007; Akopian és mtsai., 2008; Karashima és mtsai., 2008; Wang és mtsai., 2008).

3.8. A sejtmembrán szerkezete és a lipid raft modell

A sejtmembránok klasszikus fluid-mozaik modelljét Singer és Nicolson publikálta 1972-ben (Singer és Nicolson, 1972). Az elmélet szerint a membránok alkotóelemei, pl. a foszfolipidek, glikolipidek és koleszterin a termodinamika törvényszerűségeinek megfelelően egyenletesen, a fehérjék pedig random módon helyezkednek el a membránban. A vázat a foszfolipid kettősréteg alkotja, amely molekuláinak a hidrofil fej része a vizes fázisok felé, a hidrofób farki része pedig a membrán belseje, azaz a másik lipofil réteg felé orientálódik, így alakítva ki egy a vízdékony vegyületek számára átjárhatatlan gátat. A membránfehérjék a külső, vagy a belső felszínen helyezkednek el, egyes esetekben azonban többé-kevésbé bemennek a membránba (integráns membránfehérjék), illetve teljesen át is érhetik (transzmembránfehérjék) (Pálfia és Kristóf, 2013).

Ez a modell igazolást nyert több strukturális és biokémiai vizsgálat által, azonban azt a tényt nem tudta magyarázni, hogy egyes fehérjék egyenlőtlenül oszlanak el a sejtmembrán felszínén (Karnovsky és mtsai., 1982). Ennek magyarázatára alkotta meg Simons és Ikonen az úgynevezett lipid raft elméletet (Simons és Ikonen, 1997), amely szerint a membránokban megtalálhatóak speciális felépítésű és rendezettségű mikrodomének, az úgynevezett lipid raftok vagy lipid tutajok. Ezek a raft régiók koleszterinben, szfingolipidekben és gangliozidokban gazdagok, és ezek elhelyezkedése a membránon belül változó. Az extracelluláris oldal szfingomielinben és glikoszfingolipidekben gazdag, míg az intracelluláris oldalon inkább glicerofoszfolipidek helyezkednek el. A koleszterin – mint a struktúra integritásáért felelős fő komponens – egyenletes elosztottságot mutat (Simons és Ikonen, 1997; Kobayashi és mtsai., 2006; Kannan és mtsai., 2007). Ez a nagy fokú strukturális szervezettség eredményezi azt, hogy a raft régiók eltérő fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek a membrán egyéb régióihoz képest. Ilyen jellegzetes tulajdonság pl. az, hogy nem ionos detergensben (pl. 4 °C-on Triton-X100 detergensben) oldhatatlanok. Ez a tulajdonság azonban megszüntethető a fő alkotóelem a koleszterin depletálásával, ami a lipid raftok széteséséhez vezet (Brown és London, 2000). A lipid raftok sematikus ábrázolását a 7. ábra mutatja be.



7. ábra Lipid raft sematikus ábrázolása Hernaiz-Llorens és mtsai. 2021 alapján. A lipid raftokban elhelyezkedő fehérjék között gyakran alakul ki glikozil-foszfatidil-inozitol (GPI) csoport.

3.9. A lipid raftok élettani és patológiai szerepe

A lipid raftok számos funkciót töltenek be a szervezetben, pl. szabályozzák a membrántranszport folyamatokat, befolyásolják az immun-, a kardiovaszkuláris-, valamint az idegrendszer megfelelő működését (Parton és Richards, 2003; Sonnino és mtsai., 2014; Sezgin és mtsai., 2017). Ezen kívül számos gyulladásos folyamatban is regulátor szereppel bírnak, ezért Miller és munkatársai bevezették az „inflammaraft” fogalmát (Iwabuchi, 2015; Miller és mtsai., 2020). Bizonyított továbbá, hogy számos ioncsatorna, köztük több TRP receptor (Liu és mtsai., 2006; Szőke és mtsai., 2010; Sággy és mtsai., 2015), a 2-amino-3-metil-(3-hidroxi-5-metil-izoxazol-1-il)-propionsav/AMPA glutamát receptor, a γ -amino-vajsav/GABA receptor, valamint a nikotinos acetilkolin receptor lipid raftokban helyezkedik el (Hering és mtsai., 2003; Guirland és mtsai., 2004; Zhu, 2006).

Számos *malignus* daganattípussal összefüggésbe hozott fehérje is a raft régiókban helyezkedik el, pl. a többféle daganattípus kialakulásában szerepet játszó Mucin-1 (Staubach és mtsai., 2009), vagy az urokináz plazminogén aktivátor receptor, illetve a Ras fehérje, amelyek szerepet játszanak az emlődaganat kialakulásában (Raghu és mtsai., 2010; Larsen és mtsai., 2015). Ezeken a megfigyeléseken alapulva leírták, hogy egyes anyagok (pl. edelphosine, mitelphosine), amelyek módosítják a membrán szervezetségét és újra-szerveződését, tumorelles hatással rendelkeznek (Cuesta-Marbán és mtsai., 2013). A lipid raftok egy speciális altípusát alkotják a kaveolák, amelyek jellegzetes morfológiájú, kaveolin tartalmú membránelemek. A kaveoláknak jelentős szerepük van az endocitózis folyamatában, amelyről leírták, hogy többek között számos patogén – mint pl. a HIV-1 vírus, illetve bakteriális termékek (endotoxinok) – sejtbe történő penetrációjában vesznek részt. Ezt a mechanizmust erősíti tovább a raft régiókban megtalálható koleszterin tartalom, valamint a patogének specifikus receptorai, mint pl. a HIV-1 vírus csoportspecifikus antigén (group-specific antigen - Gag) fehérjéje közötti kapcsolat (Harder és mtsai., 1998; Teissier és Pécheur, 2007; Dick és mtsai., 2012; Lorizate és mtsai., 2013; Iwabuchi, 2015; Farnoud és mtsai., 2015). A patogének bejuttatásán túl azonban terápiás lehetőségeket is rejt a kaveolák működése, hiszen akár nagymolekulájú gyógyszeranyagok célba juttatása is megvalósítható ezeken keresztül (Imre és mtsai., 2020).

Egy másik speciális altípusba a ceramidban gazdag régiók tartoznak, amelyek elsősorban a szfingomielináz enzim (SMáz) hatására jönnek létre, méretük változatos, néhány nanométertől egészen mikrométeres tartományig terjed (Zhang et al., 2009). Funkciójukat tekintve a membránreceptorok klaszterizációjában van szerepük, pl. a CD40/CD40 ligand, illetve CD95/CD95 ligand jelátviteli folyamatait szabályozzák (Grassme és mtsai., 2001; Grassmé és mtsai., 2001, 2002, 2003; Zhang és mtsai., 2009). További speciális csoportot képeznek a gangliozidokban gazdag raftok, amelyek többek között a különböző toxinok sejtbe történő bejutásában, valamint az Alzheimer betegség molekuláris patomechanizmusában játszanak szerepet (Holmgren és mtsai., 1973; Falguières és mtsai., 2001; Fujinaga és mtsai., 2003; Hicks és mtsai., 2012)

3.10. A lipid raftok farmakológiai vizsgálata

A lipid raftok farmakológiai vizsgálata az elmúlt évtizedben jelentős szerepet töltött be az alap kutatásokban, és ezek középpontjában a raft régiók integritásának megbontása áll, amellyel számos jelátviteli út, valamint receptor aktivációja vizsgálható. A raft régiók megbontására alapvetően két mechanizmust különböztethetünk meg, az egyik az alkotóelemek lebontása, míg a másik a felépülés gátlása. A leginkább tanulmányozott mechanizmus a lipid raft kutatásban a koleszterin depléciója, amelyre általában metil- β -ciklodextrint (MCD) alkalmaznak, ami zárványkomplexet képez a koleszterinnel (Ilangumaran és Hoessli, 1998). A raftok szfingomielin tartalma is elbontható enzimatikusan SMáz-zal, ami foszfokolinná és ceramiddá alakítja a szfingomielineket (Chao és mtsai., 2011). Az alkotóelemek felépítését gátló szerek közül kísérletesen a szfingolipidek szintézisét gátlókat alkalmazzák. Ide tartozik a myriocin (Myr), amely a szerin-palmitoil-transzferáz enzimet – ez a sebességmeghatározó lépése a szfingolipid szintézisnek – gátolja (Miyake és mtsai., 1995).

A lipid raftokkal kapcsolatos kutatások jelentős része *in vitro* rendszerek alkalmazásával történt, és leginkább az MCD hatását vizsgálták, azonban az eredmények több esetben is ellentmondásosak. Liu és munkatársai leírták, hogy az MCD kezelés hatására nem módosul a hő által kiváltott TRPV1 aktiváció transzfektált humán embrionális vesesejteken (human embryonic kidney 293 - HEK293) (Liu és mtsai., 2003), azonban gátlódnak a protonok és CAPS által kiváltott áramok DRG neuronokon (Liu és mtsai., 2006). Vizsgálták egyéb ligandok, pl. a $^3\text{[H]RTX}$ TRPV1 receptorhoz való kötődését is, azonban ezt nem befolyásolta a koleszterin depléciója (Bari és mtsai., 2005). Az MCD hatását vizsgálták egyéb TRP ioncsatornák aktivációjára is, és azt találták, hogy képes emelni a TRP Melastatin 8 (TRPM8) receptor hőaktivációs küszöbét (Morenilla-Palao és mtsai., 2009), illetve csökkenti a TRP Canonical 1 (TRPC1) és TRP Canonical 3 (TRPC3) receptorok aktivációját (Lockwich és mtsai., 2000; Bergdahl és mtsai., 2003; Graziani és mtsai., 2006). Startek és munkatársai bizonyították, hogy MCD kezelés hatására csökken a TRPA1 receptornak a hideg ingerek, illetve bakteriális endotoxin általi aktivációja, azonban a membránon belüli expressziója változatlan marad (J. Startek és mtsai., 2019; J. B. Startek és mtsai., 2019). Hasonló hatásokat írtak le később a SMáz enzimmal is (Startek és Talavera, 2020).

Kutatócsoportunk is leírta, hogy *in vitro* körülmények között az MCD, SMáz illetve Myr előkezelés hatására a CAPS és RXT által kiváltott TRPV1 aktiváció gátolható a receptort stabilan expresszáló kínai hörcsög ovárium (Chinese Hamster Ovary - CHO) sejteken, valamint primer szenzoros neuron tenyészetben egyaránt (Szőke és mtsai., 2010; Sággy és mtsai., 2015). Szintén kutatócsoportunk írta le, hogy egy karboxamido-szteroid vegyület (C1) – amit a Pannon Egyetem Szerves Kémiai Intézetében szintetizáltak számunkra – az MCD-hez hasonló gátló hatást fejt ki a TRPV1 aktivációjára, azonban 1000-szer kisebb koncentrációban (Szánti-Pintér és mtsai., 2015; Sággy és mtsai., 2018). A lipid raft kutatásban újabb utat nyitott meg a Rv-ok (pl. RvD1 és RvD2) – endogén gyulladásgátló hatású lipidmediátorok – vizsgálata, amelyekről leírták *in vitro*, hogy saját G-protein kapcsolt fehérjékön keresztül képesek gátolni a TRPV1 aktivációját (Park és mtsai., 2011). Kutatócsoportunk feltételezése alapján a RvD1 és RvD2 nagyobb koncentrációban lipid raft károsító hatással is rendelkezhetnek és így képesek gátolni az ioncsatornák aktivációját. Ezt a hipotézist bizonyítottuk is mind a TRPV1, mind a TRPA1 esetében radioaktív $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -felvétel, illetve intracelluláris Ca^{2+} -imaging módszerekkel, valamint az anyagok membránpolaritásra kifejtett hatásainak fluoreszcens spektroszkópiai módszerekkel történő vizsgálatával (Payrits és mtsai., 2020). Szintén újabb eredmények bizonyítják a gangliozidok szerepét a lipid raftokkal összefüggésben különböző fájdalommechanizmusokban (Sántha és mtsai., 2020).

Az *in vitro* vizsgálatokon túl csupán néhány állatkísérletes adat van a lipid raftok fájdalomban betöltött szerepéről és ezek is leginkább a különböző ciklodextrin származékokkal foglalkoznak. Sauer és munkatársai írták le, hogy random-metilált- β -ciklodextrinnel (RAMEB) történő lokális vagy szisztémás előkezelés csökkenti a CFA kiváltotta termális allodíniát és mechanikai hiperalgéziát patkányokban (Sauer és mtsai., 2017). Az MCD hatékonyan csillapítja a hiperalgéziát az RTX által kiváltott neuropátia egérmódeljében (Lin és mtsai., 2019), valamint prosztagalndin E2 (PGE2) adását követően patkányokban (Ferrari és Levine, 2015). A gangliozidok szerepét is vizsgálták *in vivo*, a gangliozid GT1b intraplantaris injekciója nociceptív válaszokat váltott ki és fokozta a formalin indukálta fájdalomreakciót, azonban a szialidáz enzim – amely elbontja szialil rezidumokat a gangliozidokból - beadását követően csökkenti a kialakuló fájdalomreakciót (Watanabe és mtsai., 2011).

4. CÉLKITŰZÉSEK

A neuropátiás fájdalom kezelése mindmáig nem kielégítő, hiszen az alkalmazott gyógyszerek többsége hosszú távú alkalmazás esetén súlyos mellékhatásokat okoz és/vagy nem biztosít megfelelő klinikai hatékonyságot. Ennek oka, hogy a kapszaicin-érzékeny érzőidegvégződések farmakológiai befolyásolása számos nehézségbe ütközik többek között azért is, mert a klasszikus receptor-antagonista megközelítéssel nem tudtak eddig olyan hatóanyagot kifejleszteni, amelynek a kockázat/mellékhatás (pl. hipertermia, hőérzékelési zavarok), illetve előny aránya megfelelő klinikai hatékonysággal társult volna (Helyes és mtsai., 2003; Lee és mtsai., 2015). Éppen ezért van szükség olyan új, alternatív farmakológiai lehetőségek kutatására, mint pl. a TRP receptorok lipid raftokon keresztüli befolyásolása, amely egy új irányt nyithat meg a fájdalomcsillapítók fejlesztésében.

Munkám során ezért a következő általános célokat tűztem ki:

- 1. A lipid raft diszrupció hatásának vizsgálata a sejtmembrán polaritására és fluiditására**
- 2. Szfingolipid depléció hatásának vizsgálata a TRPV1 és TRPA1 ioncsatornák aktiválhatóságára *in vivo***
- 3. Koleszterin depléció hatásának vizsgálata a TRPV1 és TRPA1 ioncsatornák aktiválhatóságára *in vivo***

5. KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

5.1. Fluoreszcencia spektroszkópia

A 6-dodekanoil-N,N-dimetil-naftilamin (Laurdan) egy széles körben elfogadott és alkalmazott fluoreszcens festék, amely alkalmas mind biológiai, mind modell membránok tanulmányozására (Harris, Best, és Bell 2002; Gaus és mtsai. 2003). Szerkezetéből adódóan a Laurdan molekulák beépülnek a membrán foszfolipid rétegei közé, és a beépülés mértékének függvényében, valamint a membránban jelen lévő vízmolekulák – poláros fázis – arányának megfelelően változik a Laurdan fluoreszcens gerjesztési és emissziós spektruma (kék-vörös eltolódás) (Gaus és mtsai., 2003; Jay és Hamilton, 2017). A Laurdan felhasználásával fluoreszcens mikroszkópia és két foton mikroszkópia módszereket alkalmazva szelektíven vizsgálható a sejteket körülvevő, illetve a sejtek egyes kompartmentjeit határoló membránok polarizáltsága, fluiditása (Gaus és mtsai., 2003). Ezeknél a módszereknél azonban sokkal egyszerűbben kivitelezhető a fluoreszcens spektroszkópia, amely ugyancsak alkalmas a Laurdan emissziós tulajdonságainak követésére, ezáltal a membránszerkezet változásának kimutatására (Parasassi és mtsai., 1986).

A mintapreparáció során natív CHO sejteket inkubáltunk lipid raft károsító anyaggal (30 mU SMáz, 100 nM Myr, 10 mM MCD, 100 μ M C1 – extracelluláris oldatban (ECS) oldva) vagy ECS-sel 45 percig, illetve a Myr esetében 24 óráig 37 °C-on. Ezt követően a sejteket háromszor mostuk steril foszfáttal pufferelt fiziológiás sóoldattal (PBS), majd 40 μ M koncentrációjú Laurdan (ECS-ben) oldattal inkubáltuk őket 40 percig 37 °C-on. Ezután háromszor mostuk a sejteket steril PBS-sel, majd felvettük a sejteket 1 ml steril PBS-ben. A méréseket 4 mm-es úthosszúságú kvarcküvetékben (Hellma 104F-QS), rögzített, 20 °C-os hőmérsékleten FL3-2iHR spektrofluoriméterrel (HORIBA Jobin-Yvon NanoLog - 8. ábra) végeztük.



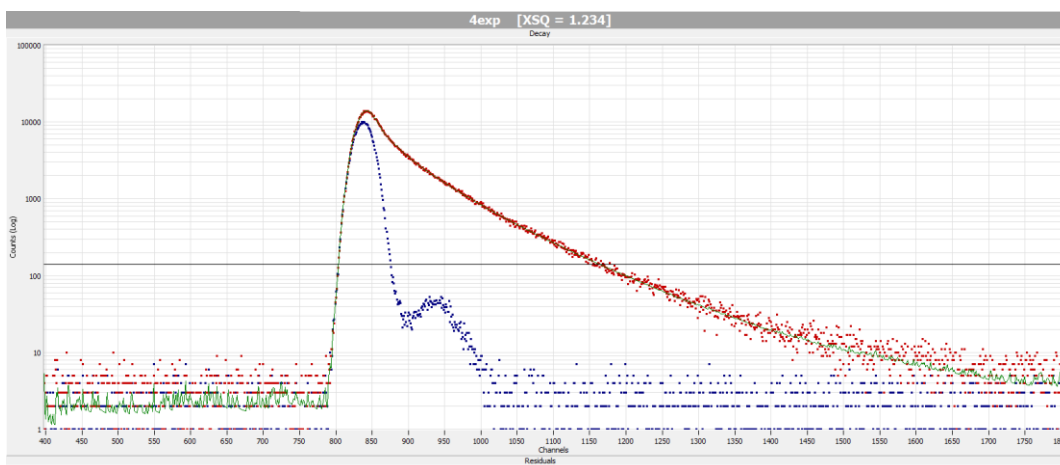
8. ábra HORIBA Jobin-Yvon NanoLog spektrofluoriméter

5.1.1. Membránpolaritás vizsgálata

A membrán polaritására – ami ellentétben a sejtbiológiai polaritással a fluoreszcens spektroszkópiában a foszfolipid kettősrétegbe beépülő poláros vízmolekulák arányától függ - a Laurdan gerjesztési és emissziós spektrumainak változásából következtethetünk, amelyek összefüggésben vannak a membrán aktuális hidratáltsági szintjével, vagyis a rendezett (liquid ordered – alacsonyabb víztartalmú) és rendezetlen (liquid disordered – magasabb víztartalmú) fázisok arányával (Golfetto, Hinde, és Gratton 2013). A gerjesztési spektrumok felvételekor 300 és 420 nm között, míg az emissziós spektrumok esetén 380 és 600 nm között változott a hullámhossz.

5.1.2. Membránfluiditás vizsgálata

A membránfluiditás vizsgálatához az emissziós spektrum 410-540 nm közötti tartományának 14 lecsengési görbéjét ($\Delta\lambda = 10$ nm) vettük fel – a 9. ábra egy reprezentatív lecsengési görbét mutat –, amelyekből 4 exponenciális illesztéssel nyertük ki az élettartam és pre-exponenciális értékeket. Az így előállított tiszta lecsengések szolgálták a további paraméterek meghatározásának alapjául. Az első vizsgált paraméter az általánosított polarizáció (GP), amely információt ad a spektrális (kék és vörös irányú) eltolódásról, ami összefüggésben van a membránba beépülő vízmolekulák arányával (Sanchez, Tricerri, és Gratton 2012).



9. ábra A Laurdan emissziójának lecsengése 420 nm-en. A piros görbe a fluoreszcencia lecsengést, a kék a gerjesztő impulzust a zöld pedig a 4 exponenciális illesztést mutatja.

A második vizsgált paraméter GP súlypontjának változását jellemző sebességi komponens (Center of Gravity - CoG), amely az oldószer-relaxációról, vagyis a Laurdan körüli membránban lévő vízmolekulák forgási mozgékonyaságáról ad információt, amelyet gyakran a membránviszkozitással azonosítanak.

A harmadik vizsgált paraméter pedig az emisszió spektrális maximumán (450 nm) időbontott polarizációs mérésekkel meghatározott anizotrópia lecsengésből származtatott rotációs élettartam (τ_{rot}) ami pedig Laurdan molekulák foszfolipid kettős rétegben való mozgékonyaságáról, azaz a membránban való bezártságáról nyújt információt (Ma és mtsai. 2018; Steinmark és mtsai. 2020).

A GP értékek meghatározásához a fluoreszcencia emissziós spektrum két jól meghatározott pontján (430 és 500 nm) mért intenzitásértékeket vettük figyelembe és az alábbi képletet alkalmaztuk:

$$GP = \frac{I_{430} - I_{500}}{I_{430} + I_{500}}$$

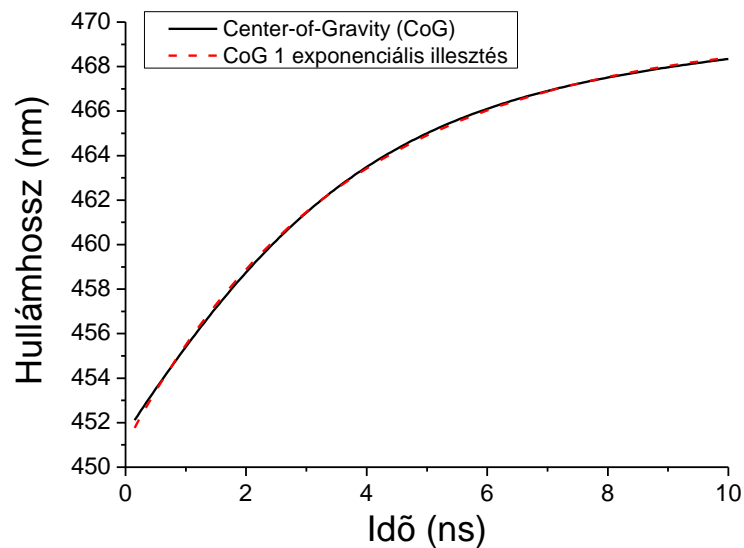
A steady-state GP érték számításához használt intenzitásadatokat a Laurdan fluoreszcencia lecsengésének integráljából határoztuk meg az alábbiak szerint:

$$I = \int_0^{\infty} I(t) dt$$

A magasabb GP értékek a spektrum színek szerinti kék irányú eltolódását jelzik, amely a Laurdan zártabb környezetben való jelenlétére utalnak, míg az alacsonyabb GP értékek a vörös irányú eltolódását jelzik és ezzel a Laurdan kevésbé zártabb környezetére lehet következtetni.

A GP függvény időbeli változásának karakterisztikáját és egyben a membrán mikroviszkozitását jellemző paramétert, a CoG(t) függvényt (egy reprezentatív görbét mutat az 10. ábra) a következő képlettel határoztuk meg:

$$CoG(t) = \frac{\sum_{\lambda_{\min}}^{\lambda_{\max}} I(\lambda, t)\lambda}{\sum_{\lambda_{\min}}^{\lambda_{\max}} I(\lambda, t)}$$



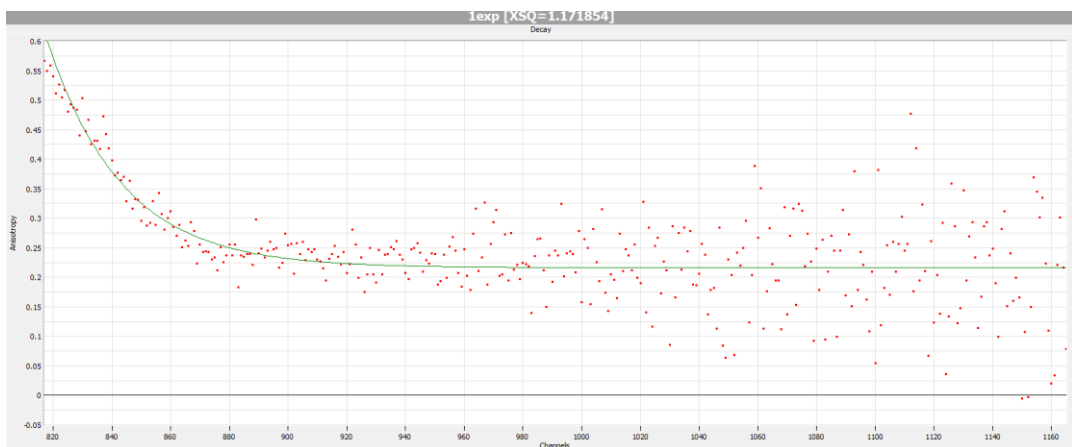
10. ábra A CoG érték változása az idő függvényében. A fekete vonal a CoG érték változását, a piros pedig az 1 exponenciális illesztést mutatja.

Megállapítottuk, hogy a CoG érték időbeli változása kiválóan leírható 1 exponenciális illesztéssel. Az így kapott CoG karakterisztikus idő alacsonyabb értéke alacsonyabb mikroviszkozitásra, míg a magasabb értéke magasabb mikroviszkozitásra utal.

Az időbontott anizotrópia mérések során – reprezentatív képet mutat a 11. ábra – a forgási élettartamot határoztuk meg az alábbi képlet segítségével:

$$r(t) = (r_0 - r_\infty) \exp\left(-\frac{t}{\tau_{\text{rot}}}\right) + r_\infty$$

ahol τ_{rot} a forgási élettartam, amely nagyobb értéke esetén a Laurdan molekulák lassabban forognak, míg kisebb érték esetén gyorsabb forgás valószínűsíthető. Ezek alapján pedig a Laurdan molekulák membránban való bezártságára lehet következtetni.



11. ábra Emissziós anizotrópia spektrum a 30 mU SMáz-zal kezelt minta esetén 450 nm-es hullámhosszon mérve. A piros görbe az anizotrópia lecsengést, a zöld pedig az 1 exponenciális illesztést mutatja.

Ezeknek a paramétereknek a külön-külön történő interpretációja a Laurdan molekulák membránban való viselkedését jellemzik, összességében pedig a membrán fluiditásáról adnak információt. Megjegyzendő azonban, hogy a fluoreszcens spektroszkópai módszer nem alkalmas a plazmamembrán szelektív vizsgálatára, hiszen a belső és külső membránrendszerek nem különíthetők el egymástól, azonban a Laurdan molekulák mindkét membránrendszerben megjelennek (Balogh és mtsai., 2011). Éppen ezért a kapott eredmények kiértékelését kvalitatív módon végeztük el, a változás irányából relatív következtetéseket vontunk le.

5.2. CAPS-kiváltotta akut kemonocéptív reakció modell

Vizsgálatainkban CAPS oldatot (20 μL , 30 $\mu\text{g/mL}$) cseppentettünk az állatok jobb szemébe, majd egy üvegalitkába helyezve őket 1 percen keresztül számoltuk a szemtörlések számát (Szőke és mtsai., 2002). Az értékelésnél csak az egy manccsal történő törléseket vettük figyelembe, a mosakodó, illetve két manccsal történő mozdulatok kizárásra kerültek. A CAPS oldat adását a kísérlet második és harmadik órájában is megismételtük.

5.3. RTX-indukálta termális allodínia és mechanikai hiperalgécia modell

Az ultrapotens, szelektív TRPV1 agonista RTX (20 μL , 0,1 $\mu\text{g/mL}$) jobb hátsó talpba injektálásával akut neurogén gyulladási választ váltottunk ki, amelyben perifériás mechanizmusok révén termális allodínia, komplex perifériás és centrális mechanizmusok révén pedig mechanikai hiperalgécia alakul ki (Pan és mtsai., 2003). A mérést megelőzően két egymást követő napon kondicionáló vizsgálatokat végeztünk a hőküszöb meghatározására emelkedő hőmérsékletű forró lap segítségével (Hot Plate, IITC Life Science, Woodland Hills, CA, Egyesült Államok), illetve a mechanikai fájdalomküszöb meghatározására Dinamikus Plantaris Eszteziométer (DPA, Ugo Basile, Comerio, Olaszország) segítségével. A vizsgálat során az RTX injektálását követően a 10., 20., és 30. percekben hőküszöb vizsgálat történt, majd a 30., 60. és 90. percekben mechanikai fájdalomküszöb meghatározásra került sor (Almási és mtsai., 2003; Payrits és mtsai., 2017; Kántás és mtsai., 2019).

5.3.1. Emelkedő hőmérsékletű forró lap (Hot Plate)

A vizsgálandó állatokat egy melegíthető fém lapra helyeztük, amelyre egy műanyag kalitkát illesztettünk. A kontroll vizsgálatok során 35 °C-ról indítva 12 °C/perc sebességgel emeltük a hőmérsékletet (maximum 53 °C-ig) addig, amíg az állatok nocifenzív viselkedést mutattak (hátsó láb nyalása, felemelése, rázása), ekkor leállítottuk a készüléket és feljegyeztük a hőmérsékletet, amely megfelelt a hőküszöbnek. Az RTX adását követően a mérést 25 °C-ról indítva 12 °C/perc sebességgel végeztük. A Hot Plate készüléket a 12. ábra mutatja be.



12. ábra Emelkedő hőmérsékletű forró lap - Hot Plate, ITC Life Science

5.3.2. Dinamikus Plantaris Eszteziométer (DPA)

A vizsgálat során az állatokat egymástól elválasztva, egymás felé átlátszatlan, de a kísérletező felé átlátszó műanyag kalitkákba helyeztük egy rácsra, ahol az állatok szabadon mozoghatnak. A DPA egy tompa végű tűvel felszerelt tükrös manipulátor, amelynek segítségével pontosan az állat hátsó talppárnáját stimuláltuk, így fejtve ki mechanikai erőhatást (max. 10 g, 2,5 g/s sebességű tű emelkedéssel). A mechanonocéptív küszöb elérésekor, vagyis amikor az állat elhárító reakciót mutat – tehát elhúzza a lábát – a digitális számláló megáll és az érték a kijelzőről grammban leolvasható. A mérések során minden esetben az állatok jobb lábát vizsgáltuk, a bal láb önkontrollként szolgált. A DPA készüléket a 13. ábra mutatja be.



13. ábra Dinamikus Plantaris Eszteziométer – DPA

5.4. Formalin-kiváltotta akut gyulladásoos fájdalom modell

A modellben a TRPA1 aktiváló formalint (20 μ L, 2,5 %) injektáltunk az egerek jobb hátsó lábába, majd a kialakuló fájdalomreakció (kezelt láb rágása, nyalása, emelve tartása, rázása) idejét mértük két fázisban, 0-5 perc között, valamint 20 és 45 perc között. Az első fázis a TRPA1 receptorok közvetlen kémiai ingerlése által közvetített fájdalomhoz kötött, amelyet egy 10-15 perc hosszúságú fájdalommentes periódus követ, majd a második fázisban a perifériás neurogén gyulladásoos folyamatok tartják fent a fájdalmat (Tjølsen és mtsai., 1992; Bölcskei és mtsai., 2005).

5.5. Anyagok

A kísérletekhez használt C1 anyagot kollaborátorunk Skodáné Dr. Földes Rita és PhD hallgatója Ispán Dávid szintetizálta számunkra a Pannon Egyetem Szerves Kémia Intézeti tanszéken. A többi anyagot a formalinon kívül (Molar Chemicals, Magyarország) – MCD, SMáz, Myr, Laurdan, CAPS, RTX – mind a Sigma-Aldrich Magyarországtól szereztük be. A C1 anyagból dimetil-szulfoxiddal (DMSO) 10 mM-os, míg a Myr-ból DMSO-val 5 mM-os törzsoldatot készítettünk. Az MCD oldatot minden kísérlet előtt frissen készítettük. A SMáz glicerines oldatban érkezett. Az *in vitro* vizsgálatokhoz az anyagokat ECS segítségével - 160 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM glükóz, pH 7,3 – hígítottuk a következő koncentrációkra: MCD (10 mM), C1 (100 μ M), SMáz (30 mU), Myr (100 nM). Az *in vivo* vizsgálatokhoz a Myr kivételével a többi anyagból fiziológias sóoldattal készítettünk hígításokat a következő koncentrációkra: MCD (15 mM), C1 (100 és 500 μ M), SMáz (50 mU). A Myr-t DMSO hígítottuk 1 mM-ra. A CAPS-ból 10 mg/mL-es törzsoldatot készítettünk (10 % etanol, 10 % Tween 80 fiziológias sóoldatban), majd fiziológias sóoldattal hígítottuk 30 μ g/mL-es koncentrációra. Az RTX-et 1 mg/mL töménységben oldottuk etanolban, majd fiziológias sóoldattal hígítottuk 0,1 μ g/mL koncentrációra. A formalint egy 6 %-os pufferelt oldatból hígítottuk 2,5 %-ra steril PBS-sel.

5.6. Etikai vonatkozások

A CAPS kiváltotta akut kemonociceptív reakció vizsgálatához 12-16 hetes hím C57BL/6, míg az RTX indukálta termális allodínia és mechanikai hiperalgészia, valamint a formalin által kiváltott akut gyulladáshoz hasonló fájdalom modellhez azonos korú és nemű NMRI egereket használtunk. Az állatokat a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetében állatházában tenyésztettük és tartottuk. Vizsgálati módszereink és eljárásaink minden tekintetben megfelelnek az állatkísérletek végzéséről szóló 1998/XXVIII. számú kormányrendelet előírásainak, valamint az Európai Parlament irányelveinek (2010/63). A Pécsi Tudományegyetem állatkísérletekkel foglalkozó Etikai Bizottsága a kísérleti protokollokat jóváhagyta (Engedélyszám: BA02/2000-45/2020).

Minden kísérlet során 4 csoportot alkalmaztunk, amelyből kettő (fiziológiás sóoldattal/DMSO-val kétszer kezelt és lipid raft károsító anyaggal, majd fiziológiás sóoldattal kezelt) kontrollként szolgált a szűrés okozta, illetve az anyagok önálló hatásaként esetlegesen fellépő fájdalom vizsgálatára. A statisztikai analízishez a két vizsgálati csoportot vettük alapul, ahol az állatok fiziológiás sóoldatot vagy anyagot kaptak előkezelésként, majd kezelésként irritáns beadása történt. A Myr esetében még egy csoportot alkalmaztunk, ahol a DMSO egyszeri és kétszeri adását hasonlítottuk össze annak érdekében, hogy a DMSO előkezelés okoz-e bármilyen szignifikáns deszenzibilizáló hatást az állatoknál.

5.7. Statisztikai analízis

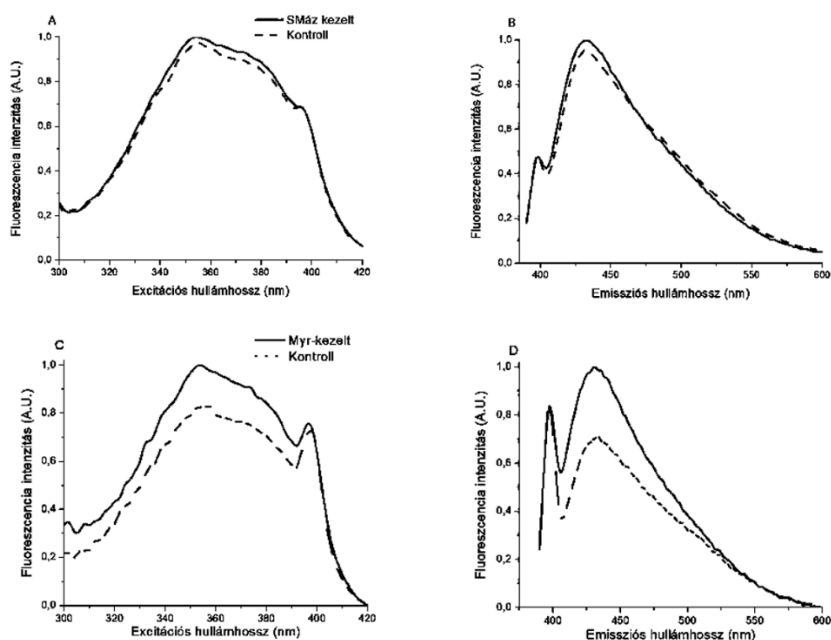
Eredményeinket minden esetben átlag \pm SEM értékben adtuk meg, amelyek legalább 6-os elemszámú állatkísérletekből kerültek kiszámításra. A kiértékeléshez minden vizsgálat esetén ismételt méréses kétutas ANOVA módszert használtunk Bonferroni post hoc teszttel kiegészítve. Szignifikánsnak tekintettünk minden olyan eredményt, amely meghaladta a $p < 0,05$ -ös értéket. Az állatkísérletek statisztikai analíziséhez a GraphPad Prism 8 szoftvert használtunk. A fluoreszcens spektroszkópiai vizsgálatok során 2-es elemszámmal dolgoztunk, a mintákat minden esetben összevontuk a mérési előírásoknak megfelelően, az adatokat pedig OriginPro 8.5 szoftverrel értékeltük.

6. EREDMÉNYEK

6.1. A lipid raft diszrupció hatásának vizsgálata a sejtmembrán polaritására és fluiditására

6.1.1. A SMáz és Myr hatása a membránpolaritásra

A membránpolaritás vizsgálatokor felvett gerjesztési (300-420 nm között) és emissziós (380-600 nm között) spektrumok a 30 mU SMáz kezelés hatására csak minimálisan változtak (14. ábra A és B panel). A 100 nM Myr kezelés azonban jelentősen és a teljes hullámhossz tartományban megváltoztatta a gerjesztési és emissziós spektrumokat, amelyből arra lehet következtetni, hogy megváltozott a membránpolaritás és a mikrokörnyezet – zártabbá vált a membrán – a kezeletlen (kontroll) mintához képest (14. ábra C és D panel).



14. ábra A Laurdan gerjesztési és emissziós spektrumainak változása 30 mU SMáz (A és B panel), illetve 100 nM Myr (C és D panel) kezelést követően. A Myr kezelés jelentősen és a teljes hullámhossz tartományban megváltoztatja a spektrumok lefutását. A folytonos vonalak a kezelt mintákat, a szaggatott vonalak a kezeletlen (kontroll) mintákat ábrázolják. N = 2

6.1.2. A lipid raft diszrupció hatása a membránfluiditásra

Az általános polarizáció meghatározásához a kezelt (30 mU SMáz, 100 nM Myr, 10 mM MCD és 100 μ M C1) és kezeletlen mintákból nyert fluoreszcencia lecsengés integrálásával kapott intenzitásértékeket vettük alapul, minden egyes esetben a saját kontrollhoz hasonlítva a kapott eredményeket. A számított GP értékeket az 1. táblázat foglalja össze.

Kezelés	Kontroll GP	Kezelt GP	Változás iránya
30 mU SMáz	0,49	0,46	Negatív
100 nM Myr	0,46	0,49	Pozitív
10 mM MCD	0,45	0,40	Negatív
100 μ M C1	0,54	0,39	Negatív

1. táblázat A GP értékei kontroll és kezelt mintákban. N = 2

A Myr kivételével minden esetben megállapítható, hogy a kezelés hatására a GP függvények értéke csökkent, ami a színek vörös irányba történő eltolódását jelenti. A vörös tartomány felé való eltolódás pedig egyértelmű bizonyítéka a membrán rendezett (liquid ordered) állapotából a rendezetlen (liquid disordered) fázisba való átmenetnek, vagyis az anyagok kisebb-nagyobb mértékben megváltoztatják a membránok mikrokörnyezetét.

A CoG függvény karakterisztikájának változását leíró sebességi paraméter számított értékeit a 2. táblázat mutatja be.

Kezelés	Kontroll τ_{CoG} (ns)	Kezelt τ_{CoG} (ns)	Változás iránya
30 mU SMáz	3,93	4,17	Pozitív
100 nM Myr	3,32	3,53	Pozitív
10 mM MCD	3,37	3,07	Negatív
100 μ M C1	4,64	5,45	Pozitív

2. táblázat A CoG változásának sebességét meghatározó τ_{CoG} értékei kontroll és kezelt mintákban. N = 2

A SMáz, Myr és C1 esetében a kezeletlen mintákhoz képest emelkedést tapasztalható a τ_{CoG} értékekben, amely a spektrális eltolódás lassulását jellemzi, amiből arra következtethetünk, hogy bizonyos mértékben megnövekedett a membrán mikroviszkozitása. Ezzel szemben az MCD esetén jelentős csökkenés látszik a τ_{CoG} értékében, ami egyértelműen gyorsabb oldószer-relaxációt, vagyis csökkent mikroviszkozitást feltételez.

Az oldószer-relaxáción túl vizsgáltuk a Laurdan molekulák mobilitási tulajdonságát is, amelynek jellemző paramétere a τ_{rot} , amit az időbontott anizotrópia spektrumok felhasználásával számíthatunk ki. A kezelt és kezeletlen minták alapján számított forgási élettartam értékeket a 3. táblázat tartalmazza.

Kezelés	Kontroll τ_{rot} (ns)	Kezelt τ_{rot} (ns)	Változás iránya
30 mU SMáz	1,60	1,40	Negatív
100 nM Myr	1,45	1,69	Pozitív
10 mM MCD	1,60	1,55	Negatív
100 μM C1	1,71	1,56	Negatív

3. táblázat A τ_{rot} értékei kontroll és kezelt mintákban. N = 2

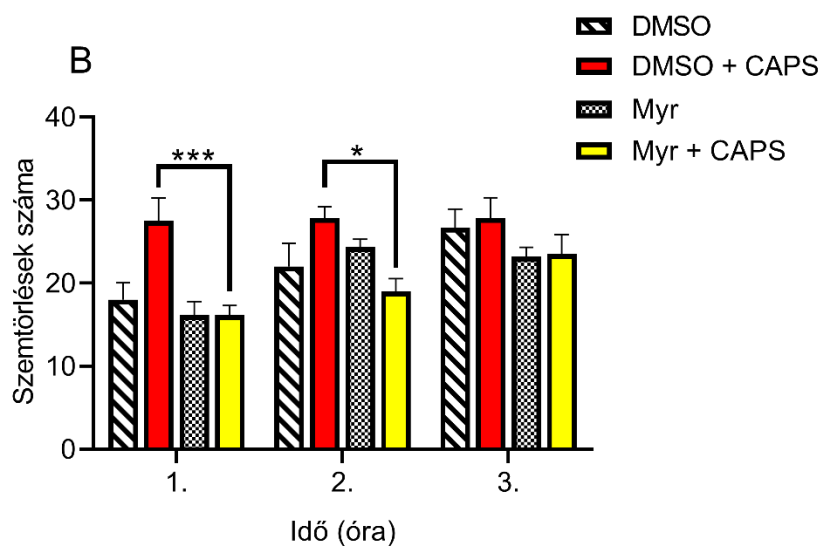
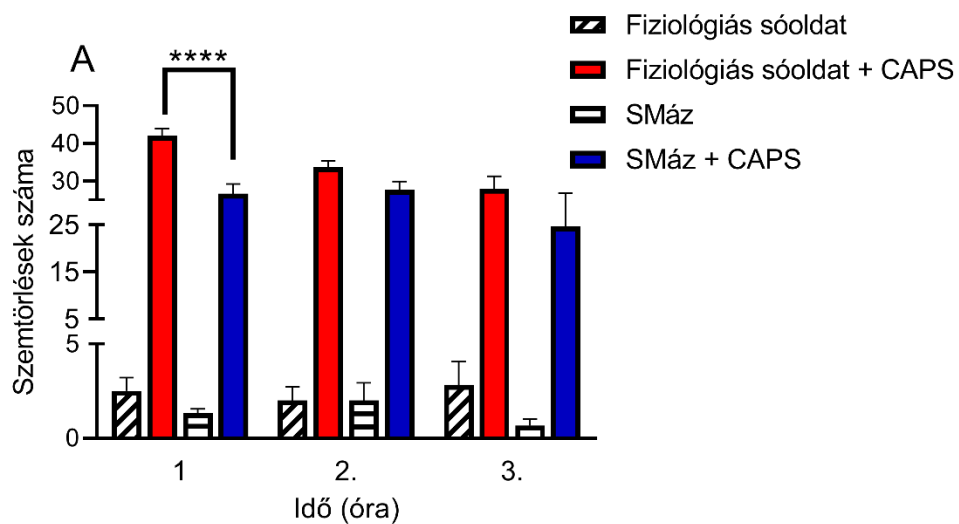
A τ_{rot} értékeinek változása információt ad a Laurdan membránban való forgási tulajdonságairól, vagyis, hogy mennyire van bezárva a molekula a membránban. A SMáz, MCD és C1 esetében az értékek csökkentek a kontrollhoz képest, ami gyorsabb forgást, ezáltal a Laurdan molekulák kisebb mértékű bezártságát jelenti, azonban a Myr esetében ezzel ellentétesen emelkedés tapasztalható, ami lassuló rotációt, ezáltal a membránban bezártabb Laurdan molekulákat feltételez.

6.2. Szfingolipid deplécio hatásának vizsgálata a TRPV1 és TRPA1 ioncsatornák aktiválhatóságára *in vivo*

6.2.1. A SMáz és Myr hatása a CAPS kiváltotta akut kemonoczeptív reakcióra

A SMáz esetében a kontrollként fiziológias sóoldattal előkezelt csoportnál a CAPS szembe cseppentésének hatására a következő szemtörlés értékeket kaptuk a kísérlet első, második és harmadik órájában: $42,0 \pm 1,8$; $33,6 \pm 1,7$ és $28,0 \pm 3,2$. Enyhe csökkenés figyelhető meg a CAPS-re adott válaszban, amely az ismételt adásból eredő TRPV1 deszenzitizációval magyarázható. A SMáz előkezelés szignifikánsan csökkentette a CAPS által kiváltott szemtörlések számát a vizsgálat első órájában, a mért értékek a következők voltak: $26,6 \pm 2,5$; $27,6 \pm 2,2$ és $24,6 \pm 2,1$ (15. ábra A panel).

A Myr esetében megvizsgáltuk az oldószer – DMSO – önálló hatását is fiziológias sóoldathoz viszonyítva, annak érdekében, hogy tapasztalható-e bármilyen deszenzibilizáló hatás, azonban nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést. A DMSO előkezelt csoportban a CAPS kiváltotta szemtörlések száma a következőképpen alakult a vizsgálati időpontokban: $27,5 \pm 2,8$; $27,8 \pm 1,4$ és $27,8 \pm 2,4$. Ezzel szemben a Myr előkezelést kapott állatok esetében az értékek a következők voltak: $16,2 \pm 1,1$; $19,0 \pm 1,5$ és $23,5 \pm 2,3$ (15. ábra B panel). A Myr előkezelés szignifikánsan csökkentette a CAPS kiváltotta akut kemonoczeptív reakciót az első és a második órában is.

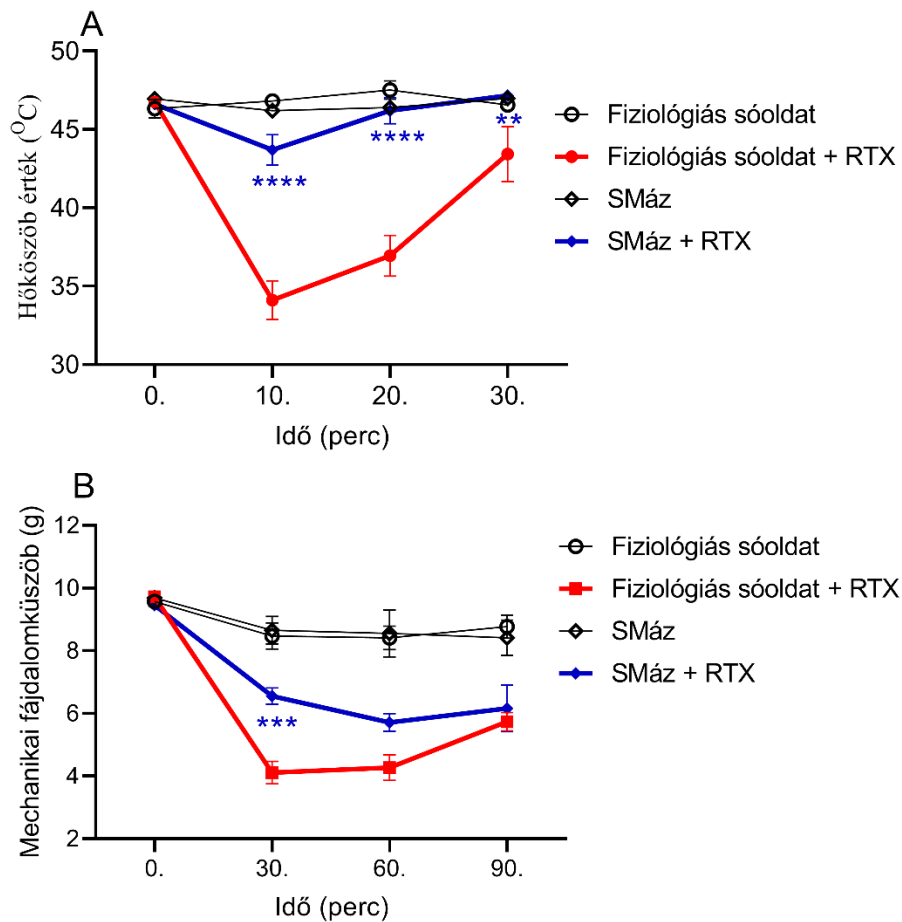


15. ábra A SMÁz (A) és Myr (B) hatása a CAPS kiváltotta akut kemonociceptív reakcióra. Mindkét vegyület szignifikánsan csökkentette a CAPS által kiváltotta szemtörlések számát az első órában, illetve a Myr a második órában is. Az adatokat ismételt mérések Bonferroni post hoc teszttel kiegészített kétutas ANOVA-val elemeztük, összehasonlításként az előkezelésnek fiziológiás sóoldatot vagy DMSO-t, illetve a csak 50mU SMÁz-t, vagy csak 1 mM Myr-t kapott csoportokat vettük. Az adatok átlag \pm SEM értékben vannak megadva, $n = 6$ állat / csoport. A szignifikanciaszintek: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

6.2.2. A SMáz és Myr hatása az RTX indukálta akut termális allodíniára és mechanikai hiperalégiára

A hőküszöb kontroll mérések során a vizsgálati csoportokban az állatok átlagosan 44-49 °C közötti hőmérsékletnél jelezték a fájdalomreakciót. Az RTX adását követően a 10., 20. és 30. percekben a fiziológias sóoldattal előkezelt csoportban a kontroll értékhez képest a termális küszöb jelentősen csökkent. A mért értékek a vizsgálati időpontokban a következők voltak: $34,1 \pm 1,2$ °C; $36,9 \pm 1,3$ °C és $43,4 \pm 1,7$ °C. A SMáz előkezelést kapott csoportban pedig az alábbi értékeket mértük a kontrollértékhez képest: $43,7 \pm 1,0$ °C; $46,2 \pm 0,8$ °C és $47,2 \pm 0,2$ °C. A SMáz előkezelés szignifikánsan gátolta az RTX adását követő termális allodínia kialakulását az összes mérési pontban a fiziológias sóoldattal szemben (16. ábra A panel).

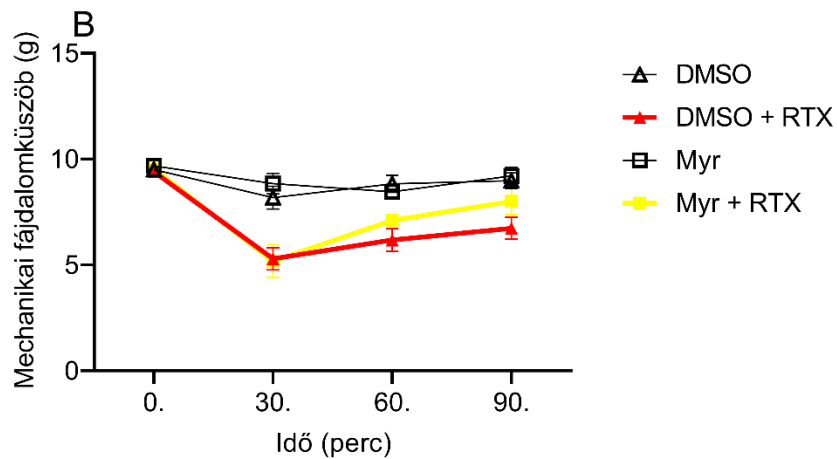
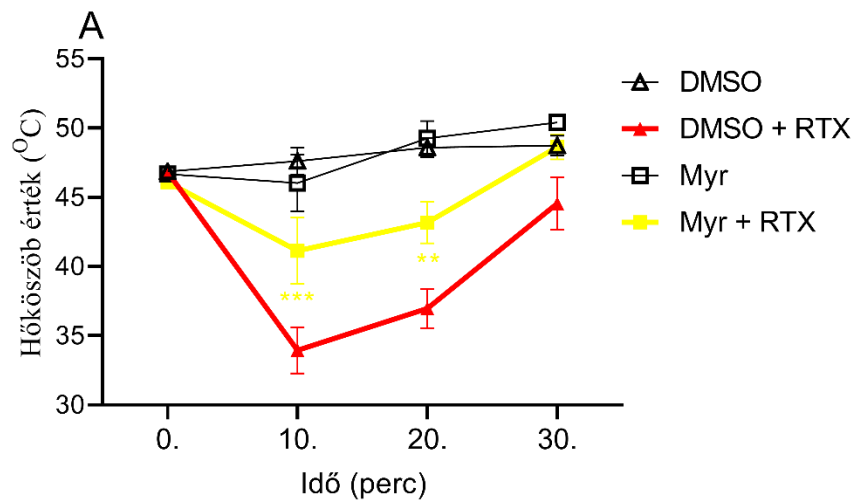
A mechanikai fájdalomküszöb tekintetében a kontroll értékek átlagosan 9 és 10 g közöttiek voltak a vizsgálati csoportokban. Az RTX injektálása után 30, 60, illetve 90 perccel a mechanikai fájdalomküszöb értéke a fiziológias sóoldattal előkezelt csoportban jelentősen csökkent. A mért értékek a következők voltak: $4,1 \pm 0,4$ g; $4,3 \pm 0,4$ g és $5,7 \pm 0,3$ g. A SMáz előkezelést kapott csoportban pedig az alábbi értékeket kaptuk a kontrollhoz képest az RTX adását követően: $6,5 \pm 0,3$ g; $5,7 \pm 0,3$ g; $6,2 \pm 0,7$ g. A SMáz előkezelés szignifikánsan gátolta a mechanikai hiperalgéria kialakulását a vizsgálat 30. percében a fiziológias sóoldattal szemben (16. ábra B panel).



16. ábra A SMÁz hatása az RTX indukálta termális allodíniára (A) és mechanikai hiperalgéziára (B). A SMÁz szignifikánsan csökkentette a hőköszöb értékének változását mindhárom vizsgálati időpontban (10., 20. és 30. perc) valamint jelentősen gátolta a mechanikai fájdalomküszöb csökkenését a 30. percben. Az adatokat ismételt mérések Bonferroni post hoc tesztel kiegészített kétutas ANOVA-val elemeztük, összehasonlításként az előkezelésnek fiziológiás sóoldatot, illetve az 50 μM SMÁz-t kapott csoportokat vettük. Az adatok átlag ± SEM értékben vannak megadva, n = 6 állat / csoport. A szignifikanciaszintek: **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

A Myr esetében a kezeletlen állatok hőküszöb kontroll értékei 44-49 °C közötti tartományba estek, míg a mechanikai fájdalomküszöb értékek 8-10 g közötti tartományban voltak a vizsgálati csoportokban. Ebben a modellben is teszteltük a DMSO önálló hatását fizioológias sóoldattal előkezelte állatokon, és nem tapasztaltunk deszenzibilizáló hatást. Az RTX injektálást követően a DMSO-val előkezelte állatok hőküszöbe a kontrollértékekhez képest jelentősen csökkent. Az értékek a következők voltak a vizsgálat 10., 20. és 30. percében: $34,0 \pm 1,7$ °C; $37,0 \pm 1,4$ °C és $44,5 \pm 1,9$ A Myr előkezelést kapott állatok esetében az RTX hatására a hőküszöb a vizsgálat 10., 20. és 30. percében $41,1 \pm 2,4$ °C és $43,2 \pm 1,5$ °C és $48,6 \pm 0,9$ °C volt. A Myr előkezelés hatására szignifikánsan csökkent a hőküszöb negatív irányú elmozdulása az RTX adását követő 10. és 20. percben a fizioológias kontrollcsoporttal összehasonlítva (17. ábra A panel).

Az RTX injektálása után a mechanikai fájdalomküszöb értékek a DMSO előkezelte állatok esetében a kontroll értékhez viszonyítva a kísérlet 30., 60. és 90. percében $5,3 \pm 0,5$ g; $6,2 \pm 0,5$ g és $6,7 \pm 0,5$ g voltak. A Myr előkezelést kapott állatok esetében az RTX hatására a fizioológias sóoldattal előkezelte csoporthoz hasonló értékeket tapasztaltunk a vizsgálati időpontokban: $5,9 \pm 0,8$ g; $7,1 \pm 0,3$ g és $8,0 \pm 0,6$ g. A Myr előkezelés nem befolyásolta az RTX kiváltotta mechanikai hiperalgéziát (17. ábra B panel).

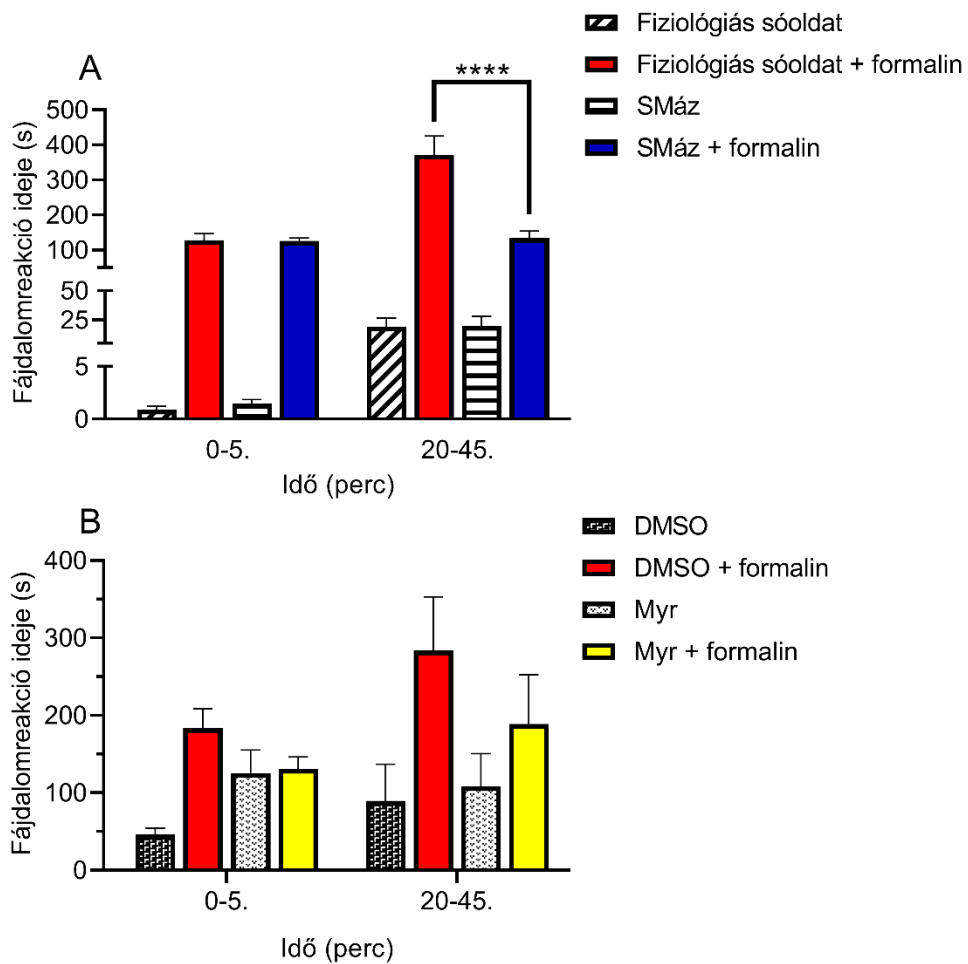


17. ábra A Myr hatása az RTX indukálta termális allodíniára (A) és mechanikai hiperalgéziára (B). A Myr szignifikánsan csökkentette a hőküszöb értékének változását a vizsgálat 10. és 20. percében, azonban hatástalan volt a vizsgálat 30. percében és nem befolyásolta a mechanikai fájdalomküszöb változását sem. Az adatokat ismételt mérések Bonferroni poszt hoc teszttel kiegészített kétutas ANOVA-val elemeztük, összehasonlításként az előkezelésnek DMSO-t, illetve az 1mM Myr-t kapott csoportokat vettük. Az adatok átlag \pm SEM értékben vannak megadva, $n = 6$ állat / csoport. A szignifikanciaszintek: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

6.2.3. A SMáz és Myr hatása a formalin indukálta akut gyulladáshoz vezető fájdalomra

A formalin által okozott, közvetlenül a TRPA1 receptorok ingerlése révén kiváltott fájdalomreakciójának időtartama (I. fázis) a fiziológiás sóoldattal előkezelt állatok esetében $127,2 \pm 18,5$ s volt, amely a SMáz előkezelés hatására nem változott szignifikánsan ($125,9 \pm 8,0$ s). Azonban a második fázisban, amelyet a perifériás gyulladás tart fent a fájdalomreakció időtartama a fiziológiás sóoldattal előkezelt kontrollcsoportban $371,1 \pm 54,4$ s, míg a SMáz előkezelést kapott állatok esetében a $134,1 \pm 20,1$ s volt (18. ábra A panel). A SMáz előkezelés tehát nem befolyásolta az első fázis időtartamát, azonban szignifikánsan csökkentette a második fázis hosszúságát a fiziológiás sóoldattal előkezelt kontrollcsoporttal összehasonlítva.

A Myr esetében teszteltük a DMSO egyszeri adásának esetleges deszenzibilizáló hatását fiziológiás sóoldattal előkezelt állatokon, de nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a kétszeri DMSO-val történő kezeléssel összevetve. A DMSO előkezelt kontrollcsoportban a formalin $183,1 \pm 25,3$ s és $283,4 \pm 69,4$ s hosszúságú fájdalomreakciót váltott ki az első és második fázisban, míg a Myr előkezelést kapott állatok esetében az időtartam a következő volt a két fázisban: $131,0 \pm 15,2$ s és $188,7 \pm 63,8$ s (18. ábra B panel). A Myr előkezelést kapott állatok értékeit összehasonlítva a fiziológiás sóoldattal előkezelt kontrollcsoport értékeivel nem mutatkozott szignifikáns különbség egyik fázisban sem.



18. ábra A SMÁz (A) és Myr (B) hatása a formalin kiváltotta akut gyulladásos fájdalomra. Egyik vegyület sem befolyásolta a formalin által okozott fájdalomreakció első fázisának hosszát, azonban a SMÁz szignifikánsan csökkentette a második fázis reakcióidejét. A Myr gyenge biológiai hatást mutatott, amely statisztikailag nem szignifikáns. Az adatokat ismételt méréseket Bonferroni poszt hoc teszttel kiegészített kétutas ANOVA-val elemeztük, összehasonlításként az előkezelésnek fiziológiás sóoldatot vagy DMSO-t, illetve a csak 50mU SMÁz-t vagy a csak 1mM Myr-t kapott csoportokat vettük. Az adatok átlag \pm SEM értékben vannak megadva, $n = 6$ állat / csoport. A szignifikanciaszintek: **** $p < 0,0001$

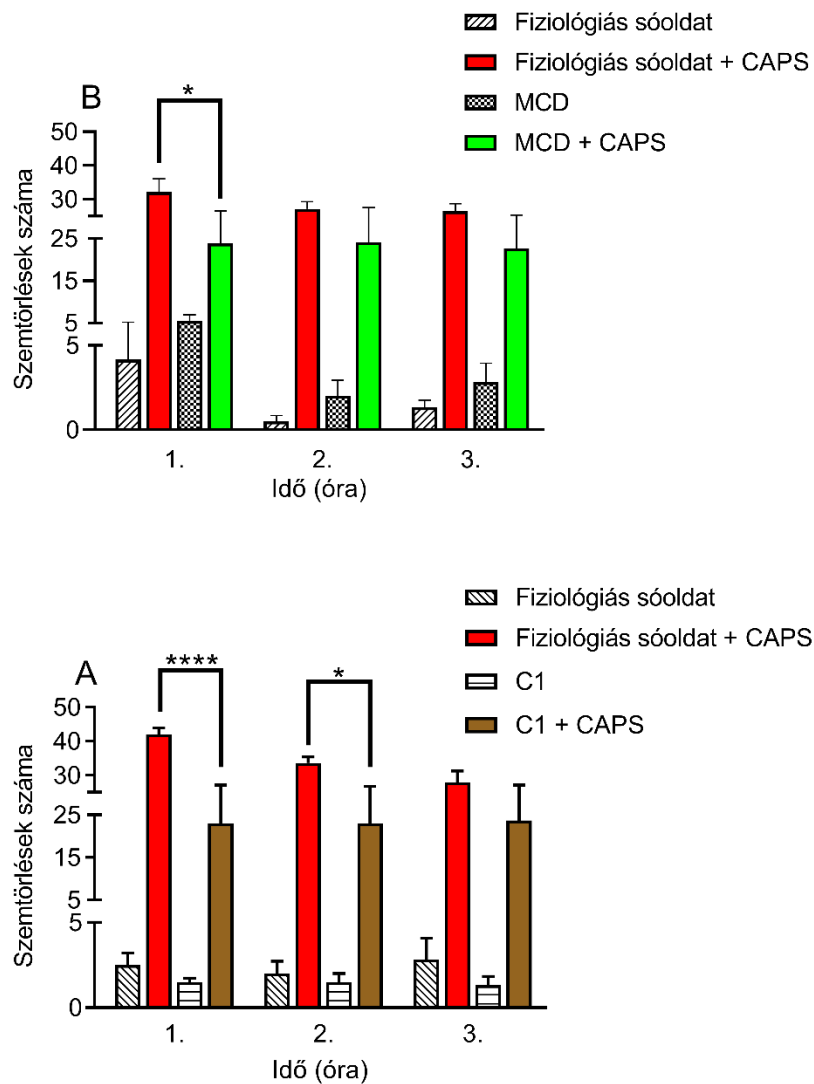
6.3. Koleszterin depléció hatásának vizsgálata a TRPV1 és TRPA1 ioncsatornák aktiválhatóságára *in vivo*

6.3.1. Az MCD és a C1 hatása a CAPS kiváltotta akut kemonociceptív reakcióra

Az MCD esetében a kontrollként fiziológiás sóoldattal előkezelt csoportnál a CAPS szembe cseppentésének hatására a következő szemtörlés értékeket kaptuk a kísérlet első, második és harmadik órájában: $32,2 \pm 3,9$; $27,2 \pm 2,1$ és $26,5 \pm 2,2$, míg az MCD-vel előkezelt állatoknál az alábbiak szerint alakultak a törlésszámok a vizsgálati időpontokban: $23,8 \pm 2,7$; $24,2 \pm 3,3$ és $22,7 \pm 2,7$ (19. ábra A panel)

A C1 esetében a fiziológiás sóoldattal előkezelt csoportban a CAPS kiváltotta szemtörlések száma a $42,0 \pm 1,9$; $33,7 \pm 1,8$ és $28,0 \pm 3,3$ volt a mérési időpontokban. Ezzel szemben a C1 előkezelést kapott állatok esetében az értékek a következők voltak: $23,0 \pm 4,2$; $23,0 \pm 3,8$ és $23,7 \pm 3,5$ (19. ábra B panel).

Mindkét esetben enyhe csökkenés figyelhető meg a CAPS-re adott válaszban az 1., 2. és 3. órában, amely az ismételt adásból eredő TRPV1 deszenzitizációval magyarázható, azonban mindkét anyag szignifikánsan csökkentette a CAPS által kiváltott szemtörlések számát az első órában, valamint a C1 a második órában is hatásosnak bizonyult.



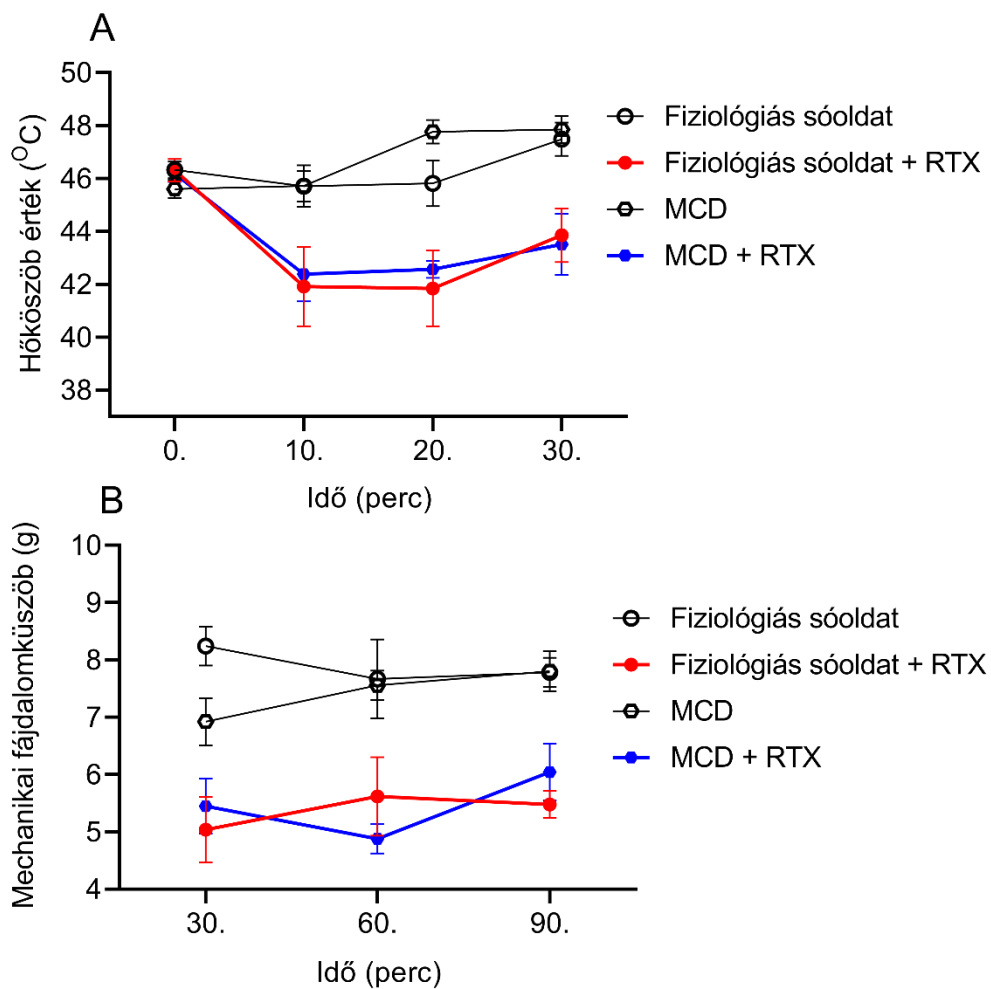
19. ábra Az MCD (A) és C1 (B) hatása a CAPS kiváltotta akut kemonociceptív reakcióra. Mindkét vegyület szignifikánsan csökkentette a CAPS által kiváltotta szemtörlések számát az első órában, valamint a C1 a második órában is. Az adatokat ismételt mérések Bonferroni poszt hoc teszttel kiegészített kétutas ANOVA-val elemeztük, összehasonlításként az előkezelésnek fiziológias sóoldatot, illetve a csak 15 mM MCD-t vagy a csak 100 μ M C1-et kapott csoportokat vettük. Az adatok átlag \pm SEM értékben vannak megadva, n = 6 állat / csoport. A szignifikanciaszintek: * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$

6.3.2. Az MCD és a C1 hatása az RTX indukálta akut termális allodíniára és mechanikai hiperalgziára

Az MCD esetében a hőküszöb kontroll mérések során az állatok átlagosan 44-49 °C közötti hőmérsékletnél jelezték a fájdalomreakciót. Az RTX adását követően a 10., 20. és 30. percekben a termális küszöbérték a fiziológias sóoldattal előkezelt csoportban a kontroll értékhez viszonyítva a következők voltak: $41,9 \pm 1,5$ °C; $41,8 \pm 1,4$ °C és $43,8 \pm 1,0$ °C. Az MCD előkezelést kapott állatok esetében az RTX hatására közel azonos csökkenést tapasztaltunk a vizsgálati időpontokban a kontroll értékhez képest, mint a fiziológias sóoldattal előkezelt állatok esetében. Az értékek a következők voltak: $42,4 \pm 1,0$ °C; $42,6 \pm 0,3$ °C $43,5 \pm 1,2$ °C (20. ábra A panel).

A mechanikai fájdalomküszöb tekintetében a kontroll értékek átlagosan 8 és 10 g közöttiek voltak. Az RTX injektálása után 30, 60, illetve 90 perccel a küszöbértékek a fiziológias sóoldattal előkezelt csoportban az alábbiak voltak a kontroll értékhez képest: $5,0 \pm 0,6$ g; $5,6 \pm 0,7$ g és $5,5 \pm 0,2$ g. Az MCD előkezelést kapott csoportban pedig az alábbi értékeket kaptuk a kontrollhoz értékhez képest: $5,4 \pm 0,5$ g; $4,9 \pm 0,3$ g; $6,4 \pm 0,5$ g (20. ábra B panel).

Az RTX hatására kialakuló termális allodíniát, illetve mechanikai hiperalgziát az MCD előkezelés a fiziológias sóoldattal előkezelt csoporthoz viszonyítva nem volt képes szignifikánsan befolyásolni.



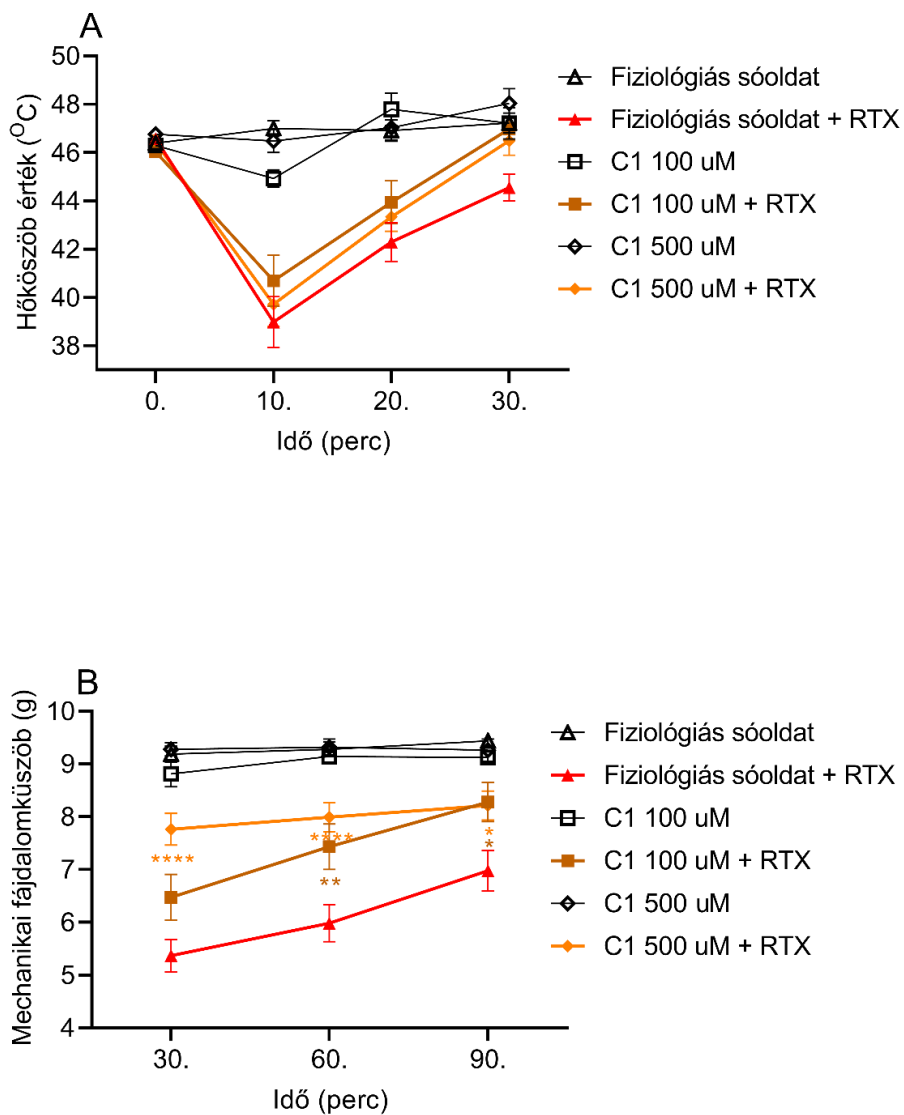
20. ábra Az MCD hatása az RTX indukálta termális allodíniára (A) és mechanikai hiperalgziára (B). Az MCD-vel történő előkezelés sem a hőköszöb csökkenésére, sem pedig a mechanikai fájdalomküszöb változására nem fejtett ki szignifikáns hatást. Az adatokat ismételt mérések Bonferroni poszt hoc tesztel kiegészített kétutas ANOVA-val elemeztük, összehasonlításként az előkezelésnek a fiziológiás sóoldatot-t, illetve a 15 mM MCD-t kapott csoportokat vettük. Az adatok átlag \pm SEM értékben vannak megadva, n = 6 állat / csoport.

A C1 esetében a termális küszöb kontrollértéke a mérések során 44-49 °C közötti tartományban volt. Az RTX injektálását követően a fiziológias sóoldattal előkezelt állatok esetében a vizsgálat 10., 20. és 30. percében a kontrollértékhez viszonyítva a következő hőküszöb értékeket mértük: $41,6 \pm 0,5$ °C; $43,0 \pm 0,6$ °C és $44,7 \pm 0,5$ °C. A C1-el – 100 μ M koncentrációban alkalmazva – történő előkezelést követően az RTX hatására a vizsgálati időpontokban a kontrollértékhez képest az alábbi eredményeket tapasztaltuk: $44,5 \pm 0,3$ °C; $45,9 \pm 0,2$ °C és $46,0 \pm 0,4$ °C (21. ábra A panel). A mechanikai fájdalomküszöb kontrollértékei 8 és 10 g közé estek. A fiziológias sóoldattal előkezelt csoportban az RTX hatására a 30., 60. és 90. percben jelentős mechanikai hiperalgèzia alakult ki, a küszöbértékek a következők voltak: $6,2 \pm 0,2$ g; $6,5 \pm 0,2$ g és $7,8 \pm 0,2$ g. A 100 μ M C1 előkezelést kapott csoport értékei az RTX hatására az alábbiak szerint alakultak a vizsgálati időpontokban: $6,0 \pm 0,5$ g; $7,2 \pm 0,5$ g és $8,3 \pm 0,5$ g (21. ábra B panel).

A 100 μ M C1 nem befolyásolta az RTX hatására kialakuló hőküszöb változást a fiziológias sóoldattal előkezeléssel összehasonlítva, azonban szignifikánsan csökkentette az RTX által kiváltott mechanikai hiperalgèziát a vizsgálat 60. és 90. percében a fiziológias sóoldattal történő előkezeléssel szemben.

Vizsgálatainkat megismételtük a C1 magasabb koncentrációjával is (500 μ M) annak érdekében, hogy teszteljük, koncentráció függő módon van-e hatása az anyagnak a termális küszöb változására. Ebben a kísérletsorozatban a kontrollcsoport megegyezett az előző C1 sorozat kontrollcsoportjával. Az 500 μ M C1-el előkezelt csoportban az RTX hatására a hőküszöb az alábbi értékeket vette fel a vizsgálat 10., 20. és 30. percében: $41,7 \pm 1,2$ °C; $43,6 \pm 0,9$ °C; $45,5 \pm 0,5$ °C, míg a mechanikai fájdalomküszöb az alábbiak szerint alakult a 30., 60. és 90. percben: $8,3 \pm 0,3$ g; $8,3 \pm 0,3$ g és $8,5 \pm 0,1$ g (21. ábra A és B panel).

A statisztikai elemzés alapján az 500 μ M C1 szignifikánsan csökkentette a mechanikai fájdalomküszöb negatív irányú változását az összes vizsgálati időpontban, azonban nem volt hatással a hőküszöb változására.

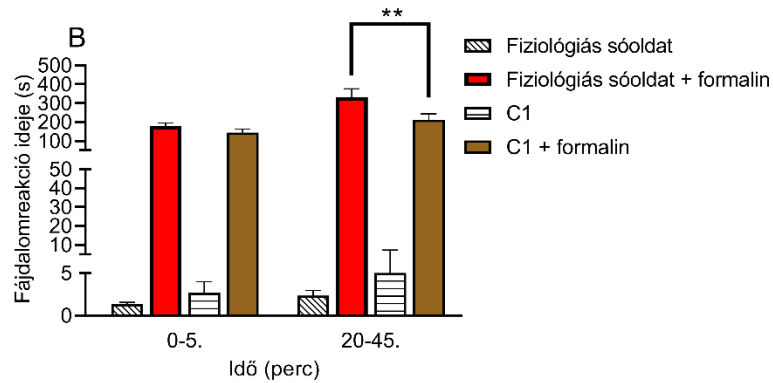
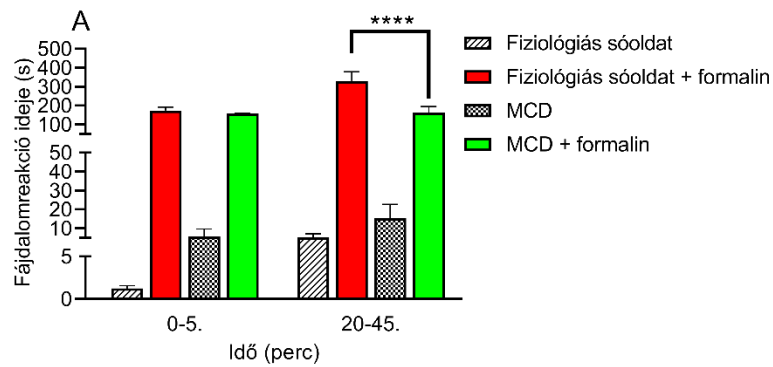


21. ábra A C1 hatása az RTX indukálta termális allodíniára (A) és mechanikai hiperalgziára (B). Az RTX hatására kialakuló hőköszöb csökkenést sem a 100 μM (barna), sem az 500 μM (narancssárga) C1 nem befolyásolta, azonban mindkettő szignifikánsan csillapította a kialakuló mechanikai hiperalgziát – a 100 μM a 60. és 90. percekben, míg az 500 μM mindhárom időpontban. Az adatokat ismételt méréses Bonferroni poszt hoc teszttel kiegészített kétutas ANOVA-val elemeztük, összehasonlításként az előkezelésnek a fiziológias sóoldatot, illetve a csak 100 vagy a csak 500 μM C1-et kapott csoportokat vettük. Az adatok átlag ± SEM értékben vannak megadva, n = 12-20 állat / csoport. A szignifikanciaszintek: *p<0,05; **p<0,01; ****p<0,0001

6.3.3. Az MCD és a C1 hatása a formalin indukálta akut gyulladáson fájdalomra

Az MCD esetében a fiziológiás sóoldattal előkezelt csoportban az állatok a formalin injektálást követően a közvetlen TRPA1 aktiváció eredményeként (I. fázis), és perifériás gyulladáson mechanizmusok által fenntartott szakaszban (II. fázis) $173,9 \pm 17,6$ és $331, \pm 45,0$ másodpercig mutattak fájdalom reakciót. Az MCD előkezelt csoportban az első fázis ideje a fiziológiás sóoldattal előkezelt kontrollcsoportéhoz képest a következő volt: $155,9 \pm 5,1$ s (I. fázis), és $163,2 \pm 31,3$ s (II. fázis) (22. ábra A panel). Az MCD előkezelés nem befolyásolta az első fázis időtartamát, azonban szignifikánsan csökkentette a második fázisét.

A C1 esetében a fiziológiás sóoldattal előkezelt kontrollcsoportban a formalin $179,5 \pm 16,0$ s és $331,5 \pm 45,0$ s időtartamú fájdalomreakciót váltott ki az első és második fázisban, míg a C1-el előkezelt csoportban az első fázisban $144,2 \pm 18,5$ s, a második fázisban $212,2 \pm 31,5$ s időtartamot mértünk (22. ábra B panel). A C1 nem befolyásolta az első fázis reakcióidejét, azonban szignifikánsan csökkentette a második fázisban kialakuló fájdalomreakció időtartamát.



22. ábra Az MCD (A) és C1 (B) hatása a formalin kiváltotta akut gyulladásos fájdalomra. Egyik vegyület sem befolyásolta a formalin által okozott fájdalomreakció első fázisának hosszát, azonban mindkét vegyület szignifikánsan csökkentette a második fázis reakcióidejét. Az adatokat ismételt mérés Bonferroni post hoc teszttel kiegészített kétutas ANOVA-val elemeztük, összehasonlításként az előkezelésnek fiziológias sóoldatot, illetve a csak 15mM MCD-t vagy a csak 100 μ M C1-et kapott csoportokat vettük. Az adatok átlag \pm SEM értékben vannak megadva, n = 6 állat / csoport. A szignifikanciaszintek: ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$

7. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

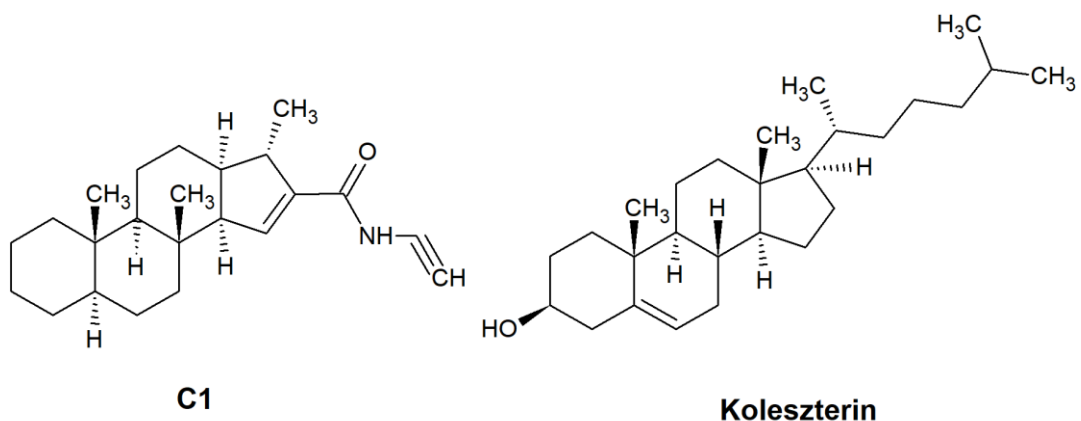
A TRPV1 és TRPA1 ioncsatornák kiemelt fontosságúak számos fiziológiai és patofiziológiai folyamatban egyaránt (Nilius és Owsianik, 2011; Nilius és Szállási, 2014), mégis a gyógyszerkutatás szempontjából a neuropátiás fájdalomban betöltött szerepük az egyik legfontosabb. Multimodális receptor tulajdonságuk miatt rengeteg anyag képes befolyásolni a működésüket, azonban a klasszikus antagonistá hatású vegyületek fejlesztése sok problémába ütközött a mellékhatások miatt (Szolcsányi és Sándor, 2012; Kaneko és Szállási, 2014; Nilius és Szállási, 2014). Egyedüli készítményként a 8 % kapszaicin tartalmú tapaszt (Qutenza®) alkalmazzuk terápiásan övsömört követő, illetve *diabetes*-es neuropátia kezelésére (Treede és mtsai., 2013; Haanpää és mtsai., 2016; Derry és mtsai., 2017). Ennek a készítménynek a hatásmechanizmusa a TRPV1 receptor tartós deszenzibilizálódásán alapul (Sharma és mtsai., 2013). Ugyan sokat tudunk az ioncsatornák működéséről, de viszonylag kevés információnk van az őket körülvevő sejtmembránnal való kapcsolatukról.

A membránok szervezettségének és egyes fehérjék inhomogén elhelyezkedésének új megközelítését nevezzük a lipid raft elméletnek (Simons és Ikonen, 1997). A lipid tutajok meghatározott mikrodomének, amelyek koleszterinben, szfingolipidekben és gangliozidokban gazdagok (Simons és Ikonen, 1997) és bizonyítottan funkcionális egységet képeznek több ioncsatornával, pl. AMPA glutamát receptorral, GABA receptorral, nikotinos acetilkolin receptorral, TRP ioncsatornákkal – többek között a PhD dolgozatom középpontjában álló TRPV1 és TRPA1 receptorokkal - (Hering és mtsai., 2003; Guirland és mtsai., 2004; Zhu, 2006; Szőke és mtsai., 2010; Sággy és mtsai., 2015, 2018). A lipid raftok befolyásolása alternatív utat nyitott meg a farmakológiai vizsgálatokban, amellyel mind a membránok mikrokörnyezetét, mind pedig a bennük elhelyezkedő fehérjék funkcionális működését vizsgálni lehet. A membránok környezetének és fluiditásának kísérletes megközelítésére alkalmas anyag a Laurdan fluoreszcens festék, amelynek gerjesztési és emissziós spektrumainak változásából következtethetünk a membrán aktuális hidratáltsági szintjére, vagyis a rendezett (liquid-ordered) és rendezetlen (liquid-disordered) fázisok arányára (Harris és mtsai., 2002; Gaus és mtsai., 2003; Golfetto és mtsai., 2013).

Ezen túl az időbontott emissziós spektrum lecsengési görbéjének jellemző paramétereivel – GP, CoG és τ_{rot} – jellemezhetjük a fluiditást (Sanchez és mtsai., 2012; Ma és mtsai., 2018; Steinmark és mtsai., 2020). Kutatócsoportunk korábban bizonyította, hogy a koleszterint depletáló MCD és C1 megváltoztatja a sejtmembrán polaritását (Sághy és mtsai., 2015, 2018). Jelenlegi vizsgálatainkban a szfingomielinek hidrolízisét végző SMáz és a szfingolipidek *de novo* szintézisét gátló Myr hatásait vizsgáltuk a membránpolaritás változására. A SMáz esetében elhanyagolhatóan kis mértékű változás látszott a Laurdan gerjesztési és emissziós spektrumában, a Myr esetében azonban szignifikáns változás volt mindkét spektrum esetében a teljes hullámhossz tartományban. A Myr kezelésnél tapasztalt pozitív irányú spektrális elmozdulás azt jelzi, hogy a Laurdan molekulák zártabb környezetbe kerültek, tehát a membránkörnyezet jelentősen megváltozott.

A fluiditás vizsgálata során a GP értékek változása a SMáz, MCD és C1 esetében vörös irányú eltolódást mutatott, amelyből megállapítható, hogy a membránrendezettség a rendezetlenebb irányba változott. Ez megállapítás összhangban van az egyéb módszerekkel végzett membránvizsgálatokkal (J. B. Startek és mtsai., 2019). A Myr esetében a GP változás a többitől eltérő, kék irányú eltérést mutatott, amely összhangban az előző méréssel azt feltételezi, hogy a sejtmembrán rendezettebb fázisba került. Ez a megfigyelés ellentétben áll azokkal az újonnan közölt eredményekkel, ahol két foton mikroszkópia segítségével vizsgálták a Myr hatásait (Monasterio és mtsai., 2022). 5 percig tartó 2,5 μM Myr kezelés hatására a Laurdan GP értékének jelentős csökkenése volt tapasztalható, azonban a szerzők megjegyzik, hogy egyéb lipidomikai analízis során emelkedett glicerofosfolipid szintet mértek, amelyek bizonyos mértékben kompenzálták a Myr hatását (Merrill és mtsai., 1997; Monasterio és mtsai., 2022). Az eredmények különbözősége feltételezhetően a koncentráció különbségből (az általunk alkalmazott 100 nM vs. 2,5 μM), a kezelés időtartamából (az általunk alkalmazott 24 óra vs. 5 perc), illetve a módszer különbözőségéből adódik, hiszen a mérések egyaránt CHO sejtek felhasználásával történtek, azonban a két foton mikroszkópiával szelektíven a plazmamembrán vizsgálható, míg a fluoreszcens spektroszkópia a sejt teljes membránrendszeréről ad információt.

A CoG értékek időbeli változásának sebességéből következtethetünk a Laurdant körülvevő oldószer relaxációjára, amely összefüggésben áll a mikroviszkozitással. A MCD-nél tapasztalt csökkenés egyértelmű jele a gyorsabb oldószer-relaxációnak, ami alacsonyabb mikroviszkozitásra utal. A SMáz, Myr és C1 esetében azonban kisebb-nagyobb mértékű növekedés volt tapasztalható a τ_{CoG} értékekben a kezelés hatására, ami a spektrális eltolódás lassulását jelenti, vagyis megnövekedett mikroviszkozitásra utal. A SMáz esetében a megfigyelésünk magyarázata lehet, hogy a szfingomielinek hidrolízise során képződő foszfokolin és ceramid a membránban maradván lassítja az oldószer relaxációs folyamatokat (Chao és mtsai., 2011; Jiang és mtsai., 2014). A Myr esetében a fent említett glicerofoszfolipid képződéssel járó folyamatok állhatnak a háttérben (Merrill és mtsai., 1997; Merrill, 2002; Monasterio és mtsai., 2022), míg a C1 esetében a koleszterinhez hasonló szerkezettel – 23. ábra - lehet magyarázni az oldószer relaxáció lassulását, ugyanis bizonyos szerkezeti hasonlóságok miatt szubsztituálhatja a koleszterint a membránban ezzel okozva a spektrális eltolódás lassulását.



23. ábra A C1 karboxamido-szteroid vegyület és a koleszterin szerkezeti képlete

A τ_{rot} esetében azt tapasztaltuk, hogy a SMáz, MCD és C1 kezelés hatására csökkentek az értékek a kontrollokhöz képest, ami egy kevésbé bezárt, tehát gyorsabban forgó Laurdan molekulát jelent. A Myr esetében itt is ellentétes eredményt kaptunk, amely a Laurdan bezártaabb jelenlétére utal. A magyarázatot a SMáz esetében a szfingomielinek, illetve foszfokolin és ceramid közötti szerkezeti különbségek adhatják meg, a C1 esetében szintén a szerkezetben keresendő a magyarázat. Az MCD esetében a koleszterin zárványkomplexebe vitele egyértelmű magyarázattal szolgál, míg a Myr esetében a glicerofosfolipidek képződése magyarázhatja a megfigyeléseket.

A strukturális-, és integritás-vizsgálatokon túl nagy jelentőséggel bír a lipid raftok farmakológiai befolyásolhatóságának és ezzel különböző receptorok és ioncsatornák aktivációjának tanulmányozása, így a TRP receptorok vizsgálata. Ugyan számos kutatócsoport foglalkozik a témával, a kísérletekben többnyire *in vitro* módszereket alkalmaznak, és az eredmények több esetben is ellentmondásosak. Kutatócsoportunk leírta, hogy a SMáz, Myr, MCD és C1 TRPV1 és TRPA1 gátló hatásokkal rendelkezik *in vitro* TG tenyészetben, valamint a receptorokat stabilan expresszáló CHO sejtvonalon (Szőke és mtsai., 2010; Sággy és mtsai., 2015, 2018). Dolgozatomban ezt a gátló hatást *in vivo* különböző akut fájdalom egérmodelljeiben vizsgáltam.

Elsőként írtuk le, hogy a szfingomielinek lebontása, illetve a szfingolipidek *de novo* szintézisének gátlása TRPV1 és TRPA1 aktiváció gátló, ezáltal antinociceptív hatásokat közvetít. A SMáz előkezelés hatására 37 %-kal, míg a Myr előkezelés hatására 41 %-kal csökkent a szemtörlések száma a CAPS-kiváltotta akut kemonociceptív reakcióban. Továbbá a Myr a második órában is hatékonynak bizonyult, amihez hozzájárulhat a hosszan tartó és komplex hatásmechanizmusa is (Wadsworth és mtsai., 2013). Kísérleteinkben bizonyítottuk azt is, hogy a SMáz előkezelés szignifikánsan csökkenti az RTX által kiváltott, főleg perifériás mechanizmusokon alapuló termális allodíniát, illetve a perifériás és centrális mechanizmusokat is magába foglaló mechanikai hiperalgéziát (Pan és mtsai., 2003). Ezzel szemben a Myr csak a hőküszöb csökkenését tudta gátolni.

A TRPA1-et aktiváló formalin esetében a jellemző kétfázisú reakcióban (Tjølsen és mtsai., 1992) az első fázis időtartamát – amely a receptorok közvetlen kémiai ingerlésének eredményeként jön létre - egyik anyag sem volt képes befolyásolni, azonban a második fázis idejét – amelyet perifériás neurogén gyulladási mechanizmusok tartanak fenn - a SMáz a kontrollcsoportéhoz viszonyítva 64 %-kal lerövidítette, a Myr azonban csak gyenge biológiai hatást mutatott, amely valószínűleg az alkalmazott oldószernek, a DMSO irritáns hatásának az eredménye.

Kutatócsoportunk bizonyította, hogy MCD előkezelés hatására a CAPS szembe cseppentésére kialakuló szemtörlések száma 32 %-kal csökkent, valamint a formalin indukálta TRPA1 aktiváció általi fájdalomreakció második fázisba 51 %-kal rövidült a kontrollcsoportéhoz viszonyítva. Az RTX által kiváltott komplex mechanizmusú fájdalommodellben egyik paraméter csökkenésére sem fejtett ki szignifikáns gátló hatást az MCD. Az MCD széles körben alkalmazott vegyület a lipid raft kutatásban, azonban a vizsgálatok szinte kivétel nélkül *in vitro* rendszerekben zajlottak (Lockwich és mtsai., 2000; Liu és mtsai., 2006; Morenilla-Palao és mtsai., 2009; Szőke és mtsai., 2010). Néhány állatkísérletes bizonyíték van az MCD és egyéb ciklodextrinek (pl. RAMEB) hatására (Ferrari és Levine, 2015; Sauer és mtsai., 2017). A saját kutatásom szempontjából kiemelendő Lin és munkatársai munkája, amelyben az MCD RTX-indukálta mononeuropátia egérmodelljében kifejtett hatásait írják le (Lin és mtsai., 2019). A szerzők kiemelik, hogy a TRPV1 gátló hatásban feltételezhetően a PIP2 és a prosztataspecifikus savanyú foszfatáz is szerepet játszik (Lin és mtsai., 2019).

Korábbi *in vitro* eredményeinkre alapozva (Szánti-Pintér és mtsai., 2015; Sággy és mtsai., 2015, 2018) igazoltuk, hogy a C1 *in vivo* is képes gátolni a TRPV1 és TRPA1 receptorok aktivációját, ami antinociceptív hatást eredményez. C1 előkezelés hatására a CAPS által kiváltott szemtörlések száma 45 %-kal csökken az első órában, illetve 26 %-kal a második órában a kontrollcsoportéhoz viszonyítva. Bár a C1 nem tudta befolyásolni az RTX indukálta termális allodíniát, de jelentősen gátolta a mechanikai fájdalomküszöb csökkenését. A TRPA1-et aktiváló formalin hatására kialakuló akut gyulladási fájdalomreakcióban a többi anyaghoz hasonlóan csak a második fázis idejét csökkentette 36 %-kal a kontrollcsoportéhoz viszonyítva.

Számos szteroid szerkezettel rendelkező vegyületről írták le, hogy képesek befolyásolni a TRP ioncsatornák funkcióját. A dehidroepiandroszteron csökkenti a CAPS által kiváltott áramokat primer szenzoros neuronon (Chen és mtsai., 2004), azonban a pontos mechanizmus nem ismert, így a szerzők feltételezik a lipid raftok befolyásolását is. A pregnenolon-szulfát, pregnanolon, pregnanolon-szulfát, progesteron és dihidrotesztoszteron 1-2 perces latenciáidővel gátolta a TRP Canonical 5 (TRPC5) ioncsatorna aktivációját, azonban a 17- β - α -ösztradiol és dehidroepiandroszteron-szulfát gyenge gátló hatással bírt. Ebből a vizsgálatból egyértelműen levonható az a következtetés, hogy az egyes szteroid vegyületeknél kiemelt fontosságú a sztereo-szelektivitás (Majeed és mtsai., 2011). Kutatócsoportunk bizonyította, hogy az α -ösztradiol a tropomioszin receptor kináz A mediálta útvonalon szenzitivizálja a TRPV1-et (Payrits és mtsai., 2017).

Eredményeink bizonyítják, hogy mind a szfingolipidek, mind a koleszterin depléciója a lipid raftokból hatékonyan gátolja a TRPV1 és TRPA1 ioncsatornák működését *in vivo* állatkísérletekben. Bár a pontos hatásmechanizmus jelenleg nem ismert, feltételezhető, hogy a lipid raftok integritásának megbontása a receptorok membránban elfoglalt helyzetének megváltozásával jár, amely bizonyos kötőhelyek elfedését okozza ezáltal gátolva az ioncsatornák aktivációját. Ezt a feltételezést erősítik a kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai is (Szőke és mtsai., 2010), amelyekben leírták, hogy a CAPS és RTX által kiváltott aktiváció eltérő módon gátolható a lipid raftok károsításával, a TRPV1 receptort expresszáló CHO sejteken, illetve primer szenzoros neuron sejt kultúrán, aminek a háttérben a kötőhelyek szempontjából kritikus aminosavak pozíciói, valamint a receptor-expresszió mértéke is szerepet játszik.

További potenciális mechanizmus lehet a C1 esetében, hogy szerkezete bizonyos elemekben hasonlít a koleszterinhez (23. ábra), és a koleszterinről leírták, hogy a koleszterin kötő doménen (cholesterol recognition amino-acid consensus motif – CRAC) keresztül közvetlenül is képes gátolni a TRPV1 CAPS, hő és feszültség által kiváltott áramait (Picazo-Juárez és mtsai., 2011; Levitan és mtsai., 2014; Morales-Lázaro és Rosenbaum, 2019).

8. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

PhD munkám során célul tűztem ki a lipid raft károsító hatású SMáz, Myr, MCD és C1 sejtmembrán paraméterekre kifejtett hatásának vizsgálatát *in vitro*, valamint a potenciális antinociceptív hatás vizsgálatát TRPV1-et és TRPA1-et aktiváló akut fájdalommodellekben egérben. Kísérleteink során az alábbi új eredményeket írtuk le:

1. Mind a négy lipid raft károsító anyag megváltoztatja a membrán jellegzetes paramétereit – membránpolaritás, GP, τ_{CoG} és τ_{rot} értékeket. A MCD egyértelműen csökkentette az összes paraméter értékét, amiből arra következtethetünk, hogy a membránfluiditás megnőtt. A SMáz, Myr és C1 esetében az értékek változása inkább a membránfluiditás csökkenésére utal.
2. A szfingolipidek depletálása 50 mU SMáz-zal vagy 1 mM Myr-nal *in vivo* antinociceptív hatásokkal bír a TRPV1 és TRPA1 aktivációjának gátlásán keresztül (4. táblázat).
3. A koleszterin depléciója 15 mM MCD-vel, illetve 100 μ M vagy 500 μ M C1-el gátolja a TRPV1 és TRPA1 aktivációját *in vivo* ezáltal közvetítve analgetikus hatást (4. táblázat).

Anyag	CAPS-kiváltotta akut kemonocicepció	RTX-indukálta termális allodínia	RTX-indukálta mechanikai hiperalgécia	Formalin-indukálta akut gyulladáshozos fájdalom
50 mU SMáz	1. óra ****	10. perc **** 20. perc **** 30. perc ***	30. perc ***	II. fázis ****
1 mM Myr	1. óra *** 2. óra *	10. perc *** 20. perc **	nsz	nsz
15 mM MCD	1. óra *	nsz	nsz	II. fázis ****
100 µM C1	1. óra **** 2. óra *	nsz	60. perc ** 90. perc *	II. fázis **
500 µM C1	nv	nsz	30. perc **** 60. perc **** 90. perc *	nv

4. táblázat *In vivo* eredmények összefoglalása. Nsz: nem szignifikáns, nv: nem vizsgáltuk. A szignifikanciaszintek: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

Vizsgálataink megerősítik azt a feltételezést, hogy a TRP receptorok működését befolyásoló – elsősorban a TRPV1 – antagonisták fejlesztési kudarcai miatt szükség van az ioncsatornák működésének befolyásolását célzó alternatív megoldások kutatása. Kutatócsoportunk fontosnak tartja a lipid raftok és TRP receptorok közötti hidrofób interakciók farmakológiai vizsgálatát, hiszen ezek a későbbiekben, mint potenciális gyógyszerkélpont hozzájárulhatnak új hatásmechanizmusú – elsősorban topikális alkalmazású – készítmények fejlesztéséhez.

9. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

1. Akopian, A.N., Ruparel, N.B., Patwardhan, A., Hargreaves, K.M., 2008. Cannabinoids Desensitize Capsaicin and Mustard Oil Responses in Sensory Neurons via TRPA1 Activation. *J. Neurosci.* 28, 1064–1075. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1565-06.2008>
2. Almási, R., Pethő, G., Bölcskei, K., Szolcsányi, J., 2003. Effect of resiniferatoxin on the noxious heat threshold temperature in the rat: a novel heat allodynia model sensitive to analgesics. *Br. J. Pharmacol.* 139, 49–58. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705234>
3. Atoyán, R., Shander, D., Botchkareva, N.V., 2009. Non-Neuronal Expression of Transient Receptor Potential Type A1 (TRPA1) in Human Skin. *J. Invest. Dermatol.* 129, 2312–2315. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.58>
4. Balogh, G., Maulucci, G., Gombos, I., Horváth, I., Török, Z., Péter, M., Fodor, E., Páli, T., Benkő, S., Parasassi, T., De Spirito, M., Harwood, J.L., Vigh, L., 2011. Heat Stress Causes Spatially-Distinct Membrane Re-Modelling in K562 Leukemia Cells. *PLoS ONE* 6, e21182. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021182>
5. Bandell, M., Story, G.M., Hwang, S.W., Viswanath, V., Eid, S.R., Petrus, M.J., Earley, T.J., Patapoutian, A., 2004. Noxious Cold Ion Channel TRPA1 Is Activated by Pungent Compounds and Bradykinin. *Neuron* 41, 849–857. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00150-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00150-3)
6. Bari, M., Battista, N., Fezza, F., Finazzi-Agrò, A., Maccarrone, M., 2005. Lipid Rafts Control Signaling of Type-1 Cannabinoid Receptors in Neuronal Cells: IMPLICATIONS FOR ANANDAMIDE-INDUCED APOPTOSIS. *J. Biol. Chem.* 280, 12212–12220. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411642200>
7. Bautista, D.M., Pellegrino, M., Tsunozaki, M., 2013. TRPA1: A Gatekeeper for Inflammation. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 181–200. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183811>

8. Bergdahl, A., Gomez, M.F., Dreja, K., Xu, S.-Z., Adner, M., Beech, D.J., Broman, J., Hellstrand, P., Swärd, K., 2003. Cholesterol Depletion Impairs Vascular Reactivity to Endothelin-1 by Reducing Store-Operated Ca²⁺ Entry Dependent on TRPC1. *Circ. Res.* 93, 839–847. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000100367.45446.A3>
9. Bevan, S., Hothi, S., Hughes, G., James, I.F., Rang, H.P., Shah, K., Walpole, C.S., Yeats, J.C., 1992. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br. J. Pharmacol.* 107, 544–552.
10. Bevan, S., Szolcsányi, J., 1990. Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. *Trends Pharmacol. Sci.* 11, 331–333. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(90\)90237-3](https://doi.org/10.1016/0165-6147(90)90237-3)
11. Bölcskei, K., Helyes, Z., Szabó, Á., Sándor, K., Elekes, K., Németh, J., Almási, R., Pintér, E., Pethő, G., Szolcsányi, J., 2005. Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice: *Pain* 117, 368–376. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.06.024>
12. Botz, B., Bölcskei, K., Helyes, Z., 2017. Challenges to develop novel anti-inflammatory and analgesic drugs: Novel anti-inflammatory and analgesic drugs. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 9, e1427. <https://doi.org/10.1002/wnan.1427>
13. Brown, D.A., London, E., 2000. Structure and Function of Sphingolipid- and Cholesterol-rich Membrane Rafts. *J. Biol. Chem.* 275, 17221–17224. <https://doi.org/10.1074/jbc.R000005200>
14. Buchholz, C.F., 1816. Chemische Untersuchung der trockenen reifen spanischen Pfeffers. *Alm. Oder Taschenb. Für Scheidekünstler Apoth.* 1–30.
15. Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D., 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816–824. <https://doi.org/10.1038/39807>

16. Chao, L., Chen, F., Jensen, K.F., Hatton, T.A., 2011. Two-Dimensional Solvent-Mediated Phase Transformation in Lipid Membranes Induced by Sphingomyelinase. *Langmuir* 27, 10050–10060. <https://doi.org/10.1021/la2015836>
17. Chen, J., Kym, P.R., 2009. TRPA1: the species difference. *J. Gen. Physiol.* 133, 623–625. <https://doi.org/10.1085/jgp.200910246>
18. Chen, S.-C., Chang, T.-J., Wu, F.-S., 2004. Competitive Inhibition of the Capsaicin Receptor-Mediated Current by Dehydroepiandrosterone in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311, 529–536. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.069096>
19. Chou, M.Z., Mtui, T., Gao, Y.-D., Kohler, M., Middleton, R.E., 2004. Resiniferatoxin Binds to the Capsaicin Receptor (TRPV1) near the Extracellular Side of the S4 Transmembrane Domain. *Biochemistry* 43, 2501–2511. <https://doi.org/10.1021/bi035981h>
20. Chu, C.J., Huang, S.M., De Petrocellis, L., Bisogno, T., Ewing, S.A., Miller, J.D., Zipkin, R.E., Daddario, N., Appendino, G., Di Marzo, V., Walker, J.M., 2003. N-Oleoyldopamine, a Novel Endogenous Capsaicin-like Lipid That Produces Hyperalgesia. *J. Biol. Chem.* 278, 13633–13639. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211231200>
21. Cosens, D.J., Manning, A., 1969. Abnormal Electroretinogram from a *Drosophila* Mutant. *Nature* 224, 285–287. <https://doi.org/10.1038/224285a0>
22. Cuesta-Marbán, Á., Botet, J., Czyz, O., Cacharro, L.M., Gajate, C., Hornillos, V., Delgado, J., Zhang, H., Amat-Guerri, F., Acuña, A.U., McMaster, C.R., Revuelta, J.L., Zarembek, V., Mollinedo, F., 2013. Drug Uptake, Lipid Rafts, and Vesicle Trafficking Modulate Resistance to an Anticancer Lysophosphatidylcholine Analogue in Yeast. *J. Biol. Chem.* 288, 8405–8418. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.425769>

23. da Costa, D.S.M., Meotti, F.C., Andrade, E.L., Leal, P.C., Motta, E.M., Calixto, J.B., 2010. The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. *Pain* 148, 431–437. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.12.002>
24. Derry, S., Rice, A.S., Cole, P., Tan, T., Moore, R.A., 2017. Topical capsaicin (high concentration) for chronic neuropathic pain in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2021. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007393.pub4>
25. Dick, R.A., Goh, S.L., Feigenson, G.W., Vogt, V.M., 2012. HIV-1 Gag protein can sense the cholesterol and acyl chain environment in model membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 18761–18766. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209408109>
26. Doerner, J.F., Gisselmann, G., Hatt, H., Wetzel, C.H., 2007. Transient Receptor Potential Channel A1 Is Directly Gated by Calcium Ions. *J. Biol. Chem.* 282, 13180–13189. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607849200>
27. Eberhardt, M.J., Filipovic, M.R., Leffler, A., de la Roche, J., Kistner, K., Fischer, M.J., Fleming, T., Zimmermann, K., Ivanovic-Burmazovic, I., Nawroth, P.P., Bierhaus, A., Reeh, P.W., Sauer, S.K., 2012. Methylglyoxal Activates Nociceptors through Transient Receptor Potential Channel A1 (TRPA1). *J. Biol. Chem.* 287, 28291–28306. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.328674>
28. Falguières, T., Mallard, F., Baron, C., Hanau, D., Lingwood, C., Goud, B., Salamero, J., Johannes, L., 2001. Targeting of Shiga Toxin B-Subunit to Retrograde Transport Route in Association with Detergent-resistant Membranes. *Mol. Biol. Cell* 12, 2453–2468. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.8.2453>
29. Farnoud, A.M., Toledo, A.M., Konopka, J.B., Del Poeta, M., London, E., 2015. Raft-Like Membrane Domains in Pathogenic Microorganisms, in: *Current Topics in Membranes*. Elsevier, pp. 233–268. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2015.03.005>
30. Ferrari, L.F., Levine, J.D., 2015. Plasma Membrane Mechanisms in a Preclinical Rat Model of Chronic Pain. *J. Pain* 16, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2014.10.007>

31. Fonyó Attila, Kollai Márk, 2014. Az orvosi élettan tankönyve. Medicina, Budapest.
32. Fujinaga, Y., Wolf, A.A., Rodighiero, C., Wheeler, H., Tsai, B., Allen, L., Jobling, M.G., Rapoport, T., Holmes, R.K., Lencer, W.I., 2003. Gangliosides That Associate with Lipid Rafts Mediate Transport of Cholera and Related Toxins from the Plasma Membrane to Endoplasmic Reticulum. *Mol. Biol. Cell* 14, 4783–4793. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-06-0354>
33. Gaus, K., Gratton, E., Kable, E.P.W., Jones, A.S., Gelissen, I., Kritharides, L., Jessup, W., 2003. Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 15554–15559. <https://doi.org/10.1073/pnas.2534386100>
34. Gees, M., Owsianik, G., Voets, T., 2012. TRP Channels, in: Terjung, R. (Ed.), *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110026>
35. Golfetto, O., Hinde, E., Gratton, E., 2013. Laurdan Fluorescence Lifetime Discriminates Cholesterol Content from Changes in Fluidity in Living Cell Membranes. *Biophys. J.* 104, 1238–1247. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.12.057>
36. Goodman, L.S., Gilman, A., Hardman, J.G., Gilman, A.G., Limbird, L.E. (Eds.), 1996. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, 9th ed. ed. McGraw-Hill, Health Professions Division, New York.
37. Grassmé, H., Cremesti, A., Kolesnick, R., Gulbins, E., 2003. Ceramide-mediated clustering is required for CD95-DISC formation. *Oncogene* 22, 5457–5470. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206540>
38. Grassme, H., Jekle, A., Riehle, A., Schwarz, H., Berger, J., Sandhoff, K., Kolesnick, R., Gulbins, E., 2001. CD95 Signaling via Ceramide-rich Membrane Rafts. *J. Biol. Chem.* 276, 20589–20596. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101207200>

39. Grassmé, H., Jendrossek, V., Bock, J., Riehle, A., Gulbins, E., 2002. Ceramide-Rich Membrane Rafts Mediate CD40 Clustering. *J. Immunol.* 168, 298–307. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.1.298>
40. Grassmé, H., Schwarz, H., Gulbins, E., 2001. Molecular Mechanisms of Ceramide-Mediated CD95 Clustering. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 1016–1030. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5045>
41. Graziani, A., Rosker, C., Kohlwein, S.D., Zhu, M.X., Romanin, C., Sattler, W., Groschner, K., Poteser, M., 2006. Cellular cholesterol controls TRPC3 function: evidence from a novel dominant-negative knockdown strategy. *Biochem. J.* 396, 147–155. <https://doi.org/10.1042/BJ20051246>
42. Grycova, L., Holendova, B., Bumba, L., Bily, J., Jirku, M., Lansky, Z., Teisinger, J., 2012. Integrative Binding Sites within Intracellular Termini of TRPV1 Receptor. *PLoS ONE* 7, e48437. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048437>
43. Guirland, C., Suzuki, S., Kojima, M., Lu, B., Zheng, J.Q., 2004. Lipid Rafts Mediate Chemotropic Guidance of Nerve Growth Cones. *Neuron* 42, 51–62. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00157-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00157-6)
44. Gunthorpe, M.J., Benham, C.D., Randall, A., Davis, J.B., 2002. The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 183–191. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(02\)01999-5](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(02)01999-5)
45. Gyires Klára, Fürst Zsuzsanna, 2011. A farmakológia alapjai. *Medicina.*
46. Haanpää, M., Cruccu, G., Nurmikko, T.J., McBride, W.T., Docu Axelarad, A., Bosilkov, A., Chambers, C., Ernault, E., Abdulahad, A.K., 2016. Capsaicin 8% patch versus oral pregabalin in patients with peripheral neuropathic pain. *Eur. J. Pain* 20, 316–328. <https://doi.org/10.1002/ejp.731>
47. Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P., Simons, K., 1998. Lipid Domain Structure of the Plasma Membrane Revealed by Patching of Membrane Components. *J. Cell Biol.* 141, 929–942. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.4.929>

48. Harris, F.M., Best, K.B., Bell, J.D., 2002. Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1565, 123–128. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(02\)00514-X](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00514-X)
49. Helyes, Z., Horváth, Á., Szőke, É., 2018. Gyógyszerfejlesztési perspektívák. *Termész. Világa* 149, 542–548.
50. Helyes, Z., Pinter, E., Nemeth, J., Szolcsanyi, J., 2003. Pharmacological Targets for the Inhibition of Neurogenic Inflammation. *Curr. Med. Chem. - Anti-Inflamm. Anti-Allergy Agents* 2, 191–218. <https://doi.org/10.2174/1568014033483806>
51. Helyes, Z., Pinter, E., Sandor, K., Elekes, K., Banvolgyi, A., Keszthelyi, D., Szoke, E., Toth, D.M., Sandor, Z., Kereskai, L., Pozsgai, G., Allen, J.P., Emson, P.C., Markovics, A., Szolcsanyi, J., 2009. Impaired defense mechanism against inflammation, hyperalgesia, and airway hyperreactivity in somatostatin 4 receptor gene-deleted mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 13088–13093. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900681106>
52. Helyes, Z., Szabó, Á., Németh, J., Jakab, B., Pintér, E., Bánvölgyi, Á., Kereskai, L., Kéri, G., Szolcsányi, J., 2004. Antiinflammatory and analgesic effects of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in a Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model in the rat: Function of Somatostatin in Chronic Inflammation. *Arthritis Rheum.* 50, 1677–1685. <https://doi.org/10.1002/art.20184>
53. Hering, H., Lin, C.-C., Sheng, M., 2003. Lipid Rafts in the Maintenance of Synapses, Dendritic Spines, and Surface AMPA Receptor Stability. *J. Neurosci.* 23, 3262–3271. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-08-03262.2003>
54. Hernaiz-Llorens, M., Martínez-Mármol, R., Roselló-Busquets, C., Soriano, E., 2021. One Raft to Guide Them All, and in Axon Regeneration Inhibit Them. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 5009. <https://doi.org/10.3390/ijms22095009>
55. Hicks, D.A., Nalivaeva, N.N., Turner, A.J., 2012. Lipid Rafts and Alzheimer's Disease: Protein-Lipid Interactions and Perturbation of Signaling. *Front. Physiol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00189>

56. Hinman, A., Chuang, H., Bautista, D.M., Julius, D., 2006. TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 19564–19568. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609598103>
57. Högyes, E., 1878. Beitrage Zur physiologischen Wirkung der Bestandteile des *Capsicum annuum*. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 117–130.
58. Holmgren, J., Lönnroth, I., Svennerholm, L., 1973. Tissue Receptor for Cholera Exotoxin: Postulated Structure from Studies with G_{M1} Ganglioside and Related Glycolipids. *Infect. Immun.* 8, 208–214. <https://doi.org/10.1128/iai.8.2.208-214.1973>
59. Holzer, P., 1988. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: Involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* 24, 739–768. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(88\)90064-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(88)90064-4)
60. Horváth, Á., Tékus, V., Bencze, N., Szentes, N., Scheich, B., Bölcskei, K., Szőke, É., Mócsai, A., Tóth-Sarudy, É., Mátyus, P., Pintér, E., Helyes, Z., 2018. Analgesic effects of the novel semicarbazide-sensitive amine oxidase inhibitor SZV 1287 in mouse pain models with neuropathic mechanisms: Involvement of transient receptor potential vanilloid 1 and ankyrin 1 receptors. *Pharmacol. Res.* 131, 231–243. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.02.006>
61. Hwang, S.W., Cho, H., Kwak, J., Lee, S.-Y., Kang, C.-J., Jung, J., Cho, S., Min, K.H., Suh, Y.-G., Kim, D., Oh, U., 2000. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: Endogenous capsaicin-like substances. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6155–6160. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.11.6155>
62. Ilangumaran, S., Hoessli, D.C., 1998. Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem. J.* 335, 433–440. <https://doi.org/10.1042/bj3350433>

63. Imre, N., Hetényi, A., Szabó, E., Bodnár, B., Szkalicity, A., Gróf, I., Bocsik, A., Deli, M.A., Horvath, P., Czibula, Á., Monostori, É., Martinek, T.A., 2020. Routing Nanomolar Protein Cargoes to Lipid Raft-Mediated/Caveolar Endocytosis through a Ganglioside GM1-Specific Recognition Tag. *Adv. Sci.* 7, 1902621. <https://doi.org/10.1002/advs.201902621>
64. Iwabuchi, K., 2015. Involvement of glycosphingolipid-enriched lipid rafts in inflammatory responses. *Front. Biosci.* 20, 325–334. <https://doi.org/10.2741/4312>
65. Jancsó, M., 1955. Speicherung. Stoffanreicherung in Retikuloendothel und in der Niere.
66. Jancsó, N., Jancsó-Gábor, A., Szolcsányi, J., 1968. THE ROLE OF SENSORY NERVE ENDINGS IN NEUROGENIC INFLAMMATION INDUCED IN HUMAN SKIN AND IN THE EYE AND PAW OF THE RAT. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 33, 32–41. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1968.tb00471.x>
67. Jancsó, N., Jancsó-Gábor, A., Szolcsányi, J., 1967. DIRECT EVIDENCE FOR NEUROGENIC INFLAMMATION AND ITS PREVENTION BY DENERVATION AND BY PRETREATMENT WITH CAPSAICIN. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 31, 138–151. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1967.tb01984.x>
68. Jara-Oseguera, A., Simon, S.A., Rosenbaum, T., 2008. TRPV1: on the road to pain relief. *Curr. Mol. Pharmacol.* 1, 255–269. <https://doi.org/10.2174/1874467210801030255>
69. Jay, A.G., Hamilton, J.A., 2017. Disorder Amidst Membrane Order: Standardizing Laurdan Generalized Polarization and Membrane Fluidity Terms. *J. Fluoresc.* 27, 243–249. <https://doi.org/10.1007/s10895-016-1951-8>
70. Jiang, X.-C., Li, Z., Yazdanyar, A., 2014. Sphingolipids and HDL Metabolism, in: *The HDL Handbook*. Elsevier, pp. 133–158. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407867-3.00006-8>

71. Jordt, S.-E., Bautista, D.M., Chuang, H., McKemy, D.D., Zygmunt, P.M., Högestätt, E.D., Meng, I.D., Julius, D., 2004. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427, 260–265. <https://doi.org/10.1038/nature02282>
72. Jordt, S.-E., Tominaga, M., Julius, D., 2000. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 8134–8139. <https://doi.org/10.1073/pnas.100129497>
73. Julius, D., 2013. TRP Channels and Pain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29, 355–384. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155833>
74. Jung, J., Shin, J.S., Lee, S.-Y., Hwang, S.W., Koo, J., Cho, H., Oh, U., 2004. Phosphorylation of Vanilloid Receptor 1 by Ca²⁺/Calmodulin-dependent Kinase II Regulates Its Vanilloid Binding. *J. Biol. Chem.* 279, 7048–7054. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311448200>
75. Kaneko, Y., Szallasi, A., 2014. Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective: Clinical perspective on TRPs. *Br. J. Pharmacol.* 171, 2474–2507. <https://doi.org/10.1111/bph.12414>
76. Kannan, K.B., Barlos, D., Hauser, C.J., 2007. Free Cholesterol Alters Lipid Raft Structure and Function Regulating Neutrophil Ca²⁺ Entry and Respiratory Burst: Correlations with Calcium Channel Raft Trafficking. *J. Immunol.* 178, 5253–5261. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.8.5253>
77. Kántás, B., Börzsei, R., Szőke, É., Bánhegyi, P., Horváth, Á., Hunyady, Á., Borbély, É., Hetényi, C., Pintér, E., Helyes, Z., 2019. Novel Drug-Like Somatostatin Receptor 4 Agonists are Potential Analgesics for Neuropathic Pain. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 6245. <https://doi.org/10.3390/ijms20246245>
78. Karashima, Y., Prenen, J., Meseguer, V., Owsianik, G., Voets, T., Nilius, B., 2008. Modulation of the transient receptor potential channel TRPA1 by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate manipulators. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* 457, 77–89. <https://doi.org/10.1007/s00424-008-0493-6>

79. Karnovsky, M.J., Kleinfeld, A.M., Hoover, R.L., Klausner, R.D., 1982. The concept of lipid domains in membranes. *J. Cell Biol.* 94, 1–6. <https://doi.org/10.1083/jcb.94.1.1>
80. Kobayashi, T., Takahashi, M., Nagatsuka, Y., Hirabayashi, Y., 2006. Lipid Rafts: New Tools and a New Component. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 1526–1531. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.1526>
81. Laing, R.J., Dhaka, A., 2016. ThermoTRPs and Pain. *The Neuroscientist* 22, 171–187. <https://doi.org/10.1177/1073858414567884>
82. Larsen, J.B., Jensen, M.B., Bhatia, V.K., Pedersen, S.L., Bjørnholm, T., Iversen, L., Uline, M., Szleifer, I., Jensen, K.J., Hatzakis, N.S., Stamou, D., 2015. Membrane curvature enables N-Ras lipid anchor sorting to liquid-ordered membrane phases. *Nat. Chem. Biol.* 11, 192–194. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1733>
83. Lee, Y., Hong, S., Cui, M., Sharma, P.K., Lee, J., Choi, S., 2015. Transient receptor potential vanilloid type 1 antagonists: a patent review (2011 – 2014). *Expert Opin. Ther. Pat.* 25, 291–318. <https://doi.org/10.1517/13543776.2015.1008449>
84. Levitan, I., Singh, D.K., Rosenhouse-Dantsker, A., 2014. Cholesterol binding to ion channels. *Front. Physiol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00065>
85. Li, M., Yu, Y., Yang, J., 2011. Structural Biology of TRP Channels, in: Islam, Md.S. (Ed.), *Transient Receptor Potential Channels, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 1–23. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0265-3_1
86. Lin, C.-L., Chang, C.-H., Chang, Y.-S., Lu, S.-C., Hsieh, Y.-L., 2019. Treatment with methyl- β -cyclodextrin prevents mechanical allodynia in resiniferatoxin neuropathy in a mouse model. *Biol. Open* 8, bio039511. <https://doi.org/10.1242/bio.039511>
87. Lishko, P.V., Procko, E., Jin, X., Phelps, C.B., Gaudet, R., 2007. The Ankyrin Repeats of TRPV1 Bind Multiple Ligands and Modulate Channel Sensitivity. *Neuron* 54, 905–918.

88. Liu, B., Hui, K., Qin, F., 2003. Thermodynamics of Heat Activation of Single Capsaicin Ion Channels VR1. *Biophys. J.* 85, 2988–3006. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74719-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74719-5)
89. Liu, M., Huang, W., Wu, D., Priestley, J.V., 2006. TRPV1, but not P2X₃, requires cholesterol for its function and membrane expression in rat nociceptors. *Eur. J. Neurosci.* 24, 1–6. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04889.x>
90. Lockwich, T.P., Liu, X., Singh, B.B., Jadowiec, J., Weiland, S., Ambudkar, I.S., 2000. Assembly of Trp1 in a Signaling Complex Associated with Caveolin-Scaffolding Lipid Raft Domains. *J. Biol. Chem.* 275, 11934–11942. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.16.11934>
91. Lorizate, M., Sachsenheimer, T., Glass, B., Habermann, A., Gerl, M.J., Kräusslich, H.-G., Brügger, B., 2013. Comparative lipidomics analysis of HIV-1 particles and their producer cell membrane in different cell lines: Lipidomics of HIV-1 particles and producer plasma membranes. *Cell. Microbiol.* 15, 292–304. <https://doi.org/10.1111/cmi.12101>
92. Ma, Y., Benda, A., Kwiatek, J., Owen, D.M., Gaus, K., 2018. Time-Resolved Laurdan Fluorescence Reveals Insights into Membrane Viscosity and Hydration Levels. *Biophys. J.* 115, 1498–1508. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.08.041>
93. Macpherson, L.J., Dubin, A.E., Evans, M.J., Marr, F., Schultz, P.G., Cravatt, B.F., Patapoutian, A., 2007. Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature* 445, 541–545. <https://doi.org/10.1038/nature05544>
94. Macpherson, L.J., Geierstanger, B.H., Viswanath, V., Bandell, M., Eid, S.R., Hwang, S., Patapoutian, A., 2005. The Pungency of Garlic: Activation of TRPA1 and TRPV1 in Response to Allicin. *Curr. Biol.* 15, 929–934. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.04.018>

95. Maggi, C.A., 1995. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Prog. Neurobiol.* 45, 1–98. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(94\)E0017-B](https://doi.org/10.1016/0301-0082(94)E0017-B)
96. Maggi, C.A., Meli, A., 1988. The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* 19, 1–43. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(88\)90002-X](https://doi.org/10.1016/0306-3623(88)90002-X)
97. Maggi, C.A., Santicioli, P., Geppetti, P., Parlani, M., Astolfi, M., Pradelles, P., Patacchini, R., Meli, A., 1988. The antagonism induced by Ruthenium Red of the actions of capsaicin on the peripheral terminals of sensory neurons: further studies. *Eur. J. Pharmacol.* 154, 1–10.
98. Majeed, Y., Amer, M., Agarwal, A., McKeown, L., Porter, K., O'Regan, D., Naylor, J., Fishwick, C., Muraki, K., Beech, D., 2011. Stereo-selective inhibition of transient receptor potential TRPC5 cation channels by neuroactive steroids: TRPC5 inhibition by steroids. *Br. J. Pharmacol.* 162, 1509–1520. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01136.x>
99. McKemy, D.D., Neuhausser, W.M., Julius, D., 2002. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416, 52–58. <https://doi.org/10.1038/nature719>
100. McNamara, C.R., Mandel-Brehm, J., Bautista, D.M., Siemens, J., Deranian, K.L., Zhao, M., Hayward, N.J., Chong, J.A., Julius, D., Moran, M.M., Fanger, C.M., 2007. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 13525–13530. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705924104>
101. Merrill, A.H., 2002. De Novo Sphingolipid Biosynthesis: A Necessary, but Dangerous, Pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 25843–25846. <https://doi.org/10.1074/jbc.R200009200>

102. Merrill, A.H., Schmelz, E.-M., Dillehay, D.L., Spiegel, S., Shayman, J.A., Schroeder, J.J., Riley, R.T., Voss, K.A., Wang, E., 1997. Sphingolipids—The Enigmatic Lipid Class: Biochemistry, Physiology, and Pathophysiology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142, 208–225. <https://doi.org/10.1006/taap.1996.8029>
103. Micko, K., 1899. Ueber den wirksamen Bestandtheil des Cayennepfeffers. *Z. Für Unters. Nahr.- Genussm.* 2, 411–412. <https://doi.org/10.1007/BF02529197>
104. Micko, K., 1898. Zur Kenntniss des Capsaïcins. *Z. Für Unters. Nahr.- Genussm.* 1, 818–829. <https://doi.org/10.1007/BF02529190>
105. Miller, Y.I., Navia-Pelaez, J.M., Corr, M., Yaksh, T.L., 2020. Lipid rafts in glial cells: role in neuroinflammation and pain processing. *J. Lipid Res.* 61, 655–666. <https://doi.org/10.1194/jlr.TR119000468>
106. Min, J.-W., Liu, W.-H., He, X.-H., Peng, B.-W., 2013. Different types of toxins targeting TRPV1 in pain. *Toxicon* 71, 66–75.
107. Minke, B., Wu, C.-F., Pak, W.L., 1975. Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature* 258, 84–87. <https://doi.org/10.1038/258084a0>
108. Miyake, Y., Kozutsumi, Y., Nakamura, S., Fujita, T., Kawasaki, T., 1995. Serine Palmitoyltransferase Is the Primary Target of a Sphingosine-like Immunosuppressant, ISP-1/Myriocin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211, 396–403. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1827>
109. Mohapatra, D.P., Nau, C., 2005. Regulation of Ca²⁺-dependent Desensitization in the Vanilloid Receptor TRPV1 by Calcineurin and cAMP-dependent Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* 280, 13424–13432. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410917200>
110. Mohapatra, D.P., Nau, C., 2003. Desensitization of Capsaicin-activated Currents in the Vanilloid Receptor TRPV1 Is Decreased by the Cyclic AMP-dependent Protein Kinase Pathway. *J. Biol. Chem.* 278, 50080–50090. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306619200>

111. Monasterio, B.G., Jiménez-Rojo, N., García-Arribas, A.B., Riezman, H., Goñi, F.M., Alonso, A., 2022. Plasma membrane effects of sphingolipid-synthesis inhibition by myriocin in CHO cells: a biophysical and lipidomic study. *Sci. Rep.* 12, 955. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04648-z>
112. Morales-Lázaro, S.L., Rosenbaum, T., 2019. Cholesterol as a Key Molecule That Regulates TRPV1 Channel Function, in: Rosenhouse-Dantsker, A., Bukiya, A.N. (Eds.), *Direct Mechanisms in Cholesterol Modulation of Protein Function, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 105–117. https://doi.org/10.1007/978-3-030-14265-0_6
113. Morales-Lázaro, S.L., Simon, S.A., Rosenbaum, T., 2013. The role of endogenous molecules in modulating pain through transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1): Modulation of TRPV1. *J. Physiol.* 591, 3109–3121. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.251751>
114. Moran, M.M., McAlexander, M.A., Bíró, T., Szallasi, A., 2011. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 601–620. <https://doi.org/10.1038/nrd3456>
115. Morenilla-Palao, C., Pertusa, M., Meseguer, V., Cabedo, H., Viana, F., 2009. Lipid Raft Segregation Modulates TRPM8 Channel Activity. *J. Biol. Chem.* 284, 9215–9224. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807228200>
116. Nelson, E.K., 1919. THE CONSTITUTION OF CAPSAICIN, THE PUNGENT PRINCIPLE OF CAPSICUM. *J. Am. Chem. Soc.* 41, 1115–1121. <https://doi.org/10.1021/ja02228a011>
117. Nilius, B., 2007. Transient receptor potential (TRP) cation channels: rewarding unique proteins. *Bull. Mem. Acad. R. Med. Belg.* 162, 244–253.
118. Nilius, B., Owsianik, G., 2011. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol.* 12, 218. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-3-218>

119. Nilius, B., Szallasi, A., 2014. Transient Receptor Potential Channels as Drug Targets: From the Science of Basic Research to the Art of Medicine. *Pharmacol. Rev.* 66, 676–814. <https://doi.org/10.1124/pr.113.008268>
120. Nozawa, K., Kawabata-Shoda, E., Doihara, H., Kojima, R., Okada, H., Mochizuki, S., Sano, Y., Inamura, K., Matsushime, H., Koizumi, T., Yokoyama, T., Ito, H., 2009. TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 3408–3413. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805323106>
121. Numazaki, M., Tominaga, T., Takeuchi, K., Murayama, N., Toyooka, H., Tominaga, M., 2003. Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 8002–8006. <https://doi.org/10.1073/pnas.1337252100>
122. Oláh, Z., Rédei, D., Pecze, L., Vizler, C., Jósvey, K., Forgó, P., Winter, Z., Dombi, G., Szakonyi, G., Hohmann, J., 2017. Pellitorine, an extract of *Tetradium daniellii*, is an antagonist of the ion channel TRPV1. *Phytomedicine* 34, 44–49.
123. Pálfia, Z., Kristóf, Z., 2013. *A sejtbiológiai alapjai*. ELTE.
124. Pan, H.-L., Khan, G.M., Alloway, K.D., Chen, S.-R., 2003. Resiniferatoxin Induces Paradoxical Changes in Thermal and Mechanical Sensitivities in Rats: Mechanism of Action. *J. Neurosci.* 23, 2911–2919. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-07-02911.2003>
125. Papakosta, M., Dalle, C., Haythornthwaite, A., Cao, L., Stevens, E.B., Burgess, G., Russell, R., Cox, P.J., Phillips, S.C., Grimm, C., 2011. The Chimeric Approach Reveals That Differences in the TRPV1 Pore Domain Determine Species-specific Sensitivity to Block of Heat Activation. *J. Biol. Chem.* 286, 39663–39672. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.273581>
126. Parasassi, T., Conti, F., Gratton, E., 1986. Time-resolved fluorescence emission spectra of Laurdan in phospholipid vesicles by multifrequency phase and modulation fluorometry. *Cell. Mol. Biol.* 32, 103–108.

127. Park, C.-K., Xu, Z.-Z., Liu, T., Lu, N., Serhan, C.N., Ji, R.-R., 2011. Resolvin D2 Is a Potent Endogenous Inhibitor for Transient Receptor Potential Subtype V1/A1, Inflammatory Pain, and Spinal Cord Synaptic Plasticity in Mice: Distinct Roles of Resolvin D1, D2, and E1. *J. Neurosci.* 31, 18433–18438. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4192-11.2011>
128. Parton, R.G., Richards, A.A., 2003. Lipid Rafts and Caveolae as Portals for Endocytosis: New Insights and Common Mechanisms: **Caveolae/Lipid Raft-Dependent Endocytosis**. *Traffic* 4, 724–738. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2003.00128.x>
129. Payrits, M., Horváth, Á., Biró-Sütő, T., Erostyák, J., Makkai, G., Sággy, É., Pohóczky, K., Kecskés, A., Kecskés, M., Szolcsányi, J., Helyes, Z., Szőke, É., 2020. Resolvin D1 and D2 Inhibit Transient Receptor Potential Vanilloid 1 and Ankyrin 1 Ion Channel Activation on Sensory Neurons via Lipid Raft Modification. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 5019. <https://doi.org/10.3390/ijms21145019>
130. Payrits, M., Sággy, É., Cseko, K., Pohóczky, K., Bölcskei, K., Ernszt, D., Barabás, K., Szolcsányi, J., Ábrahám, I.M., Helyes, Z., Szoke, É., 2017. Estradiol Sensitizes the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Receptor in Pain Responses. *Endocrinology* 158, 3249–3258. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00101>
131. Payrits, M., Sággy, É., Mátyus, P., Czompa, A., Ludmerczki, R., Deme, R., Sándor, Z., Helyes, Zs., Szőke, É., 2016. A novel 3-(4,5-diphenyl-1,3-oxazol-2-yl)propanal oxime compound is a potent Transient Receptor Potential Ankyrin 1 and Vanilloid 1 (TRPA1 and V1) receptor antagonist. *Neuroscience* 324, 151–162. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.02.049>
132. Peier, A.M., Moqrich, A., Hergarden, A.C., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Story, G.M., Earley, T.J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S., Patapoutian, A., 2002. A TRP Channel that Senses Cold Stimuli and Menthol. *Cell* 108, 705–715. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00652-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00652-9)

133. Phillips, A.M., Bull, A., Kelly, L.E., 1992. Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the *trp* phototransduction gene. *Neuron* 8, 631–642. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90085-R](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90085-R)
134. Picazo-Juárez, G., Romero-Suárez, S., Nieto-Posadas, A., Llorente, I., Jara-Oseguera, A., Briggs, M., McIntosh, T.J., Simon, S.A., Ladrón-de-Guevara, E., Islas, L.D., Rosenbaum, T., 2011. Identification of a Binding Motif in the S5 Helix That Confers Cholesterol Sensitivity to the TRPV1 Ion Channel. *J. Biol. Chem.* 286, 24966–24976. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.237537>
135. Pintér, E., Helyes, Z., Szolcsányi, J., 2006. Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception. *Pharmacol. Ther.* 112, 440–456. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.04.010>
136. Pintér, E., Szolcsányi, J., 1996. Systemic anti-inflammatory effect induced by antidromic stimulation of the dorsal roots in the rat. *Neurosci. Lett.* 212, 33–36. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12766-X](https://doi.org/10.1016/0304-3940(96)12766-X)
137. Pintér, E., Szolcsányi, J., 1988. Inflammatory and antiinflammatory effects of antidromic stimulation of dorsal roots in the rat. *Agents Actions* 25, 240–242. <https://doi.org/10.1007/BF01965023>
138. Premkumar, L.S., Ahern, G.P., 2000. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* 408, 985–990. <https://doi.org/10.1038/35050121>
139. Prescott, E.D., Julius, D., 2003. A Modular PIP₂ Binding Site as a Determinant of Capsaicin Receptor Sensitivity. *Science* 300, 1284–1288. <https://doi.org/10.1126/science.1083646>
140. Raghu, H., Sodadasu, P.K., Malla, R.R., Gondi, C.S., Estes, N., Rao, J.S., 2010. Localization of uPAR and MMP-9 in lipid rafts is critical for migration, invasion and angiogenesis in human breast cancer cells. *BMC Cancer* 10, 647. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-647>

141. Reid, G., Flonta, M.-L., 2002. Ion channels activated by cold and menthol in cultured rat dorsal root ganglion neurones. *Neurosci. Lett.* 324, 164–168. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)00181-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)00181-7)
142. Rosenbaum, T., Gordon-Shaag, A., Munari, M., Gordon, S.E., 2004. Ca²⁺/Calmodulin Modulates TRPV1 Activation by Capsaicin. *J. Gen. Physiol.* 123, 53–62.
143. Sággy, É., Payrits, M., Bíró-Sütő, T., Skoda-Földes, R., Szánti-Pintér, E., Erostyák, J., Makkai, G., Sétáló, G., Kollár, L., Kőszegi, T., Csepregi, R., Szolcsányi, J., Helyes, Z., Szőke, É., 2018. Carboxamido steroids inhibit the opening properties of transient receptor potential ion channels by lipid raft modulation. *J. Lipid Res.* 59, 1851–1863. <https://doi.org/10.1194/jlr.M084723>
144. Sággy, É., Szőke, É., Payrits, M., Helyes, Z., Börzsei, R., Erostyák, J., Jánosi, T.Z., Sétáló Jr, G., 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. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.07.028>
145. Salas, M.M., Hargreaves, K.M., Akopian, A.N., 2009. TRPA1-mediated responses in trigeminal sensory neurons: interaction between TRPA1 and TRPV1. *Eur. J. Neurosci.* 29, 1568–1578. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06702.x>
146. Sanchez, S.A., Triccerri, M.A., Gratton, E., 2012. Laurdan generalized polarization fluctuations measures membrane packing micro-heterogeneity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 7314–7319. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118288109>
147. Sántha, P., Dobos, I., Kis, G., Jancsó, G., 2020. Role of Gangliosides in Peripheral Pain Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1005. <https://doi.org/10.3390/ijms21031005>
148. Sauer, R.-S., Rittner, H.L., Roewer, N., Sohajda, T., Shityakov, S., Brack, A., Broscheit, J.-A., 2017. A Novel Approach for the Control of Inflammatory Pain: Prostaglandin E2 Complexation by Randomly Methylated β -Cyclodextrins. *Anesth. Analg.* 124, 675–685. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000001674>

149. Sertuerner, 1817. Ueber das Morphinum, eine neue salzfähige Grundlage, und die Mekonsäure, als Hauptbestandtheile des Opiums. *Ann. Phys.* 55, 56–89. <https://doi.org/10.1002/andp.18170550104>
150. Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., Eggeling, C., 2017. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 361–374. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.16>
151. Sharma, S.K., Vij, A.S., Sharma, M., 2013. Mechanisms and clinical uses of capsaicin. *Eur. J. Pharmacol.* 720, 55–62.
152. Siemens, J., Zhou, S., Piskrowski, R., Nikai, T., Lumpkin, E.A., Basbaum, A.I., King, D., Julius, D., 2006. Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. *Nature* 444, 208–212. <https://doi.org/10.1038/nature05285>
153. Simons, K., Ikonen, E., 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569–572. <https://doi.org/10.1038/42408>
154. Singer, S.J., Nicolson, G.L., 1972. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes: Cell membranes are viewed as two-dimensional solutions of oriented globular proteins and lipids. *Science* 175, 720–731. <https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720>
155. Smart, D., Gunthorpe, M.J., Jerman, J.C., Nasir, S., Gray, J., Muir, A.I., Chambers, J.K., Randall, A.D., Davis, J.B., 2000. The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br. J. Pharmacol.* 129, 227–230. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703050>
156. Sonnino, S., Aureli, M., Grassi, S., Mauri, L., Prioni, S., Prinetti, A., 2014. Lipid Rafts in Neurodegeneration and Neuroprotection. *Mol. Neurobiol.* 50, 130–148. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8614-4>
157. Späth, E., Darling, S.F., 1930. Synthese des Capsaicins. *Berichte Dtsch. Chem. Ges. B Ser.* 63, 737–743. <https://doi.org/10.1002/cber.19300630331>

158. Startek, J., Boonen, B., Talavera, K., Meseguer, V., 2019. TRP Channels as Sensors of Chemically-Induced Changes in Cell Membrane Mechanical Properties. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 371. <https://doi.org/10.3390/ijms20020371>
159. Startek, J.B., Boonen, B., López-Requena, A., Talavera, A., Alpizar, Y.A., Ghosh, D., Van Ranst, N., Nilius, B., Voets, T., Talavera, K., 2019. Mouse TRPA1 function and membrane localization are modulated by direct interactions with cholesterol. *eLife* 8, e46084. <https://doi.org/10.7554/eLife.46084>
160. Startek, J.B., Talavera, K., 2020. Lipid Raft Destabilization Impairs Mouse TRPA1 Responses to Cold and Bacterial Lipopolysaccharides. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 3826. <https://doi.org/10.3390/ijms21113826>
161. Staubach, S., Razawi, H., Hanisch, F.-G., 2009. Proteomics of MUC1-containing lipid rafts from plasma membranes and exosomes of human breast carcinoma cells MCF-7. *PROTEOMICS* 9, 2820–2835. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800793>
162. Steinmark, I.E., Chung, P., Ziolek, R.M., Cornell, B., Smith, P., Levitt, J.A., Tregidgo, C., Molteni, C., Yahioğlu, G., Lorenz, C.D., Suhling, K., 2020. Time-Resolved Fluorescence Anisotropy of a Molecular Rotor Resolves Microscopic Viscosity Parameters in Complex Environments. *Small* 16, 1907139. <https://doi.org/10.1002/sml.201907139>
163. Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Andersson, D.A., Hwang, S.W., McIntyre, P., Jegla, T., Bevan, S., Patapoutian, A., 2003. ANKTM1, a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons, Is Activated by Cold Temperatures. *Cell* 112, 819–829. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00158-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00158-2)
164. Szallasi, A., Blumberg, P.M., 1999. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.* 51, 159–212.
165. Szallasi, A., Blumberg, P.M., 1990. Specific binding of resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog, by dorsal root ganglion membranes. *Brain Res.* 524, 106–111. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90498-Z](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90498-Z)

166. Szánti-Pintér, E., Wouters, J., Gömör, Á., Sággy, 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. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.10.016>
167. Szőke, É., Börzsei, R., Tóth, D.M., Lengl, O., Helyes, Z., Sándor, Z., Szolcsányi, J., 2010. Effect of lipid raft disruption on TRPV1 receptor activation of trigeminal sensory neurons and transfected cell line. *Eur. J. Pharmacol.* 628, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.11.052>
168. Szőke, E., Seress, L., Szolcsányi, J., 2002. Neonatal capsaicin treatment results in prolonged mitochondrial damage and delayed cell death of B cells in the rat trigeminal ganglia. *Neuroscience* 113, 925–937. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00208-7](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00208-7)
169. Szolcsányi, J., Barthó, L., 1982. Capsaicin-sensitive non-cholinergic excitatory innervation of the guinea-pig tracheobronchial smooth muscle. *Neurosci. Lett.* 34, 247–251. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(82\)90183-5](https://doi.org/10.1016/0304-3940(82)90183-5)
170. Szolcsányi, J., 1987. Selective responsiveness of polymodal nociceptors of the rabbit ear to capsaicin, bradykinin and ultra-violet irradiation. *J. Physiol.* 388, 9–23. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1987.sp016598>
171. Szolcsányi, J., 1983. Tetrodotoxin-resistant non-cholinergic neurogenic contraction evoked by capsaicinoids and piperine on the guinea-pig trachea. *Neurosci. Lett.* 42, 83–88. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(83\)90426-3](https://doi.org/10.1016/0304-3940(83)90426-3)
172. Szolcsányi, J., Barthó, L., 1979. Capsaicin-sensitive innervation of the guinea-pig taenia caeci. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 309, 77–82. <https://doi.org/10.1007/BF00498759>

173. Szolcsányi, J., Barthó, L., 1978. New type of nerve-mediated cholinergic contractions of the guinea-pig small intestine and its selective blockade by capsaicin. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 305, 83–90. <https://doi.org/10.1007/BF00497009>
174. Szolcsányi, J., Jancsó-Gábor, A., 1976. Sensory effects of capsaicin congeners. Part II: Importance of chemical structure and pungency in desensitizing activity of capsaicin-type compounds. *Arzneimittelforschung.* 26, 33–37.
175. Szolcsányi, J., Jancsó-Gábor, A., 1975. Sensory effects of capsaicin congeners I. Relationship between chemical structure and pain-producing potency of pungent agents. *Arzneimittelforschung.* 25, 1877–1881.
176. Szolcsányi, J., Pinter, E., Helyes, Z., Petho, G., 2011. Inhibition of the Function of TRPV1-Expressing Nociceptive Sensory Neurons by Somatostatin 4 Receptor Agonism: mechanism and Therapeutical Implications. *Curr. Top. Med. Chem.* 11, 2253–2263. <https://doi.org/10.2174/156802611796904852>
177. Szolcsányi, J., Sándor, Z., 2012. Multimeric TRPV1 nociceptor: a target for analgesics. *Trends Pharmacol. Sci.* 33, 646–655. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.09.002>
178. Szolcsányi, J., Sándor, Z., Pethő, G., Varga, A., Bölcskei, K., Almási, R., Riedl, Z., Hajos, G., Czéh, G., 2004. Direct evidence for activation and desensitization of the capsaicin receptor by N-oleoyldopamine on TRPV1-transfected cell, line in gene deleted mice and in the rat. *Neurosci. Lett.* 361, 155–158. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.12.025>
179. Teissier, É., Pécheur, E.-I., 2007. Lipids as modulators of membrane fusion mediated by viral fusion proteins. *Eur. Biophys. J.* 36, 887–899. <https://doi.org/10.1007/s00249-007-0201-z>
180. Thresh, L.T., 1876. Isolation of capsaicin. *Pharm. J. Trans.* 3, 941–947.

181. Tjølsen, A., Berge, O.G., Hunnskaar, S., Rosland, J.H., Hole, K., 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51, 5–17.
182. Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Basbaum, A.I., Julius, D., 1998. The Cloned Capsaicin Receptor Integrates Multiple Pain-Producing Stimuli. *Neuron* 21, 531–543. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80564-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80564-4)
183. Treede, R.-D., Wagner, T., Kern, K.-U., Husstedt, I.W., Arendt, G., Bircklein, F., Cegla, T., Freynhagen, R., Gockel, H.-H., Heskamp, M.-L., Jager, H., Joppich, R., Maier, C., Leffler, A., Nagelein, H.-H., Rolke, R., Seddigh, S., Sommer, C., Stander, S., Wasner, G., Baron, R., 2013. Mechanism- and experience-based strategies to optimize treatment response to the capsaicin 8% cutaneous patch in patients with localized neuropathic pain. *Curr. Med. Res. Opin.* 29, 527–538. <https://doi.org/10.1185/03007995.2013.781019>
184. Trevisani, M., Siemens, J., Materazzi, S., Bautista, D.M., Nassini, R., Campi, B., Imamachi, N., Andre, E., Patacchini, R., Cottrell, G.S., Gatti, R., Basbaum, A.I., Bunnett, N.W., Julius, D., Geppetti, P., 2007. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 13519–13524. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705923104>
185. Vellani, V., Mapplebeck, S., Moriondo, A., Davis, J.B., McNaughton, P.A., 2001. Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J. Physiol.* 534, 813–825. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.00813.x>
186. Vilceanu, D., Stucky, C.L., 2010. TRPA1 Mediates Mechanical Currents in the Plasma Membrane of Mouse Sensory Neurons. *PLoS ONE* 5, e12177. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012177>

187. Wadsworth, J.M., Clarke, D.J., McMahon, S.A., Lowther, J.P., Beattie, A.E., Langridge-Smith, P.R.R., Broughton, H.B., Dunn, T.M., Naismith, J.H., Campopiano, D.J., 2013. The Chemical Basis of Serine Palmitoyltransferase Inhibition by Myriocin. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 14276–14285. <https://doi.org/10.1021/ja4059876>
188. Wang, S., Dai, Y., Fukuoka, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Obata, K., Cui, X., Tominaga, M., Noguchi, K., 2008. Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. *Brain* 131, 1241–1251. <https://doi.org/10.1093/brain/awn060>
189. Watanabe, S., Tan-No, K., Tadano, T., Higashi, H., 2011. Intraplantar injection of gangliosides produces nociceptive behavior and hyperalgesia via a glutamate signaling mechanism: *Pain* 152, 327–334. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.10.036>
190. Welch, J.M., Simon, S.A., Reinhart, P.H., 2000. The activation mechanism of rat vanilloid receptor 1 by capsaicin involves the pore domain and differs from the activation by either acid or heat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 13889–13894. <https://doi.org/10.1073/pnas.230146497>
191. Winter, Z., Buhala, A., Ötvös, F., Jósvay, K., Vizler, C., Dombi, G., Szakonyi, G., Oláh, Z., 2013. Functionally Important Amino Acid Residues in the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) Ion Channel - An Overview of the Current Mutational Data. *Mol. Pain* 9, 1744-8069-9–30.
192. Xu, Z.-Z., Zhang, L., Liu, T., Park, J.Y., Berta, T., Yang, R., Serhan, C.N., Ji, R.-R., 2010. Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. *Nat. Med.* 16, 592–597. <https://doi.org/10.1038/nm.2123>
193. Zhang, Y., Li, X., Becker, K.A., Gulbins, E., 2009. Ceramide-enriched membrane domains—Structure and function. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1788, 178–183. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.07.030>
194. Zhu, D., 2006. Lipid Rafts Serve as a Signaling Platform for Nicotinic Acetylcholine Receptor Clustering. *J. Neurosci.* 26, 4841–4851. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2807-05.2006>

195. Zygmunt, P.M., Petersson, J., Andersson, D.A., Chuang, H., Sørsgård, M., Di Marzo, V., Julius, D., Högestätt, E.D., 1999. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400, 452–457. <https://doi.org/10.1038/22761>

10. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

10.1. Az értekezés alapját képező publikációk

Horváth Ádám*, Biró-Sütő Tünde*, Kántás Boglárka, Payrits Maja, Skodáné-Földes Rita, Szánti-Pintér Eszter, Helyes Zsuzsanna, Szőke Éva. Antinociceptive effects of lipid raft disruptors, a novel carboxamido-steroid and methyl β -cyclodextrin, in mice by inhibiting Transient Receptor Potential Vanilloid 1 and Ankyrin 1 ion channel activation. *Frontiers in Physiology*. 11, 559109 (2020) DOI: 10.3389/fphys.2020.559109; * megosztott elsőszerező

IF: 4,14

Horváth Ádám, Payrits Maja, Steib Anita, Kántás Boglárka, Biró-Sütő Tünde, Erostyák János, Makkai Géza, Sággy Éva, Helyes Zsuzsanna, Szőke Éva. Analgesic effects of lipid raft disruption by sphingomyelase and myriocin via Transient Receptor Potential Vanilloid 1 and Transient Receptor Potential Ankyrin 1 ion channel modulation. *Frontiers in Pharmacology*. 11, 593319 (2021) DOI: 10.3389/fphar.2020.593319

IF: 5,51

10.2. Egyéb eredeti közlemények

Kántás Boglárka, Börzsei Rita, Szőke Éva, Bánhegyi Péter, **Horváth Ádám**, Hunyady Ágnes, Borbély Éva, Hetényi Csaba, Pintér Erika, Helyes Zsuzsanna. Novel Drug Like Somastostatin Receptor 4 Agonists are Potential Analgesics for Neuropathic Pain. *International Journal of Molecular Sciences*. 20 (24): 6245 (2019). DOI: 10.3390/ijms20246245

IF: 4,56

Payrits Maja, **Horváth Ádám**, Biró-Sütő Tünde, Erostyák János, Makkai Géza, Sággy Éva, Pohóczky Krisztina, Kecskés Angéla, Kecskés Miklós, Szolcsányi János, Helyes Zsuzsanna, Szőke Éva. Resolvin D1 and D2 inhibit Transient Receptor Potential Vanilloid 1 and Ankyrin 1 ion Channel Activation on sensory neurons via lipid raft modification. *International Journal of Molecular Sciences*. 21 (14): 5019 (2020). DOI: 10.3390/ijms21145019

IF:5,54

Kántás Boglárka, Szőke Éva, Börzsei Rita, Bánhegyi Péter, Junaid Ashgar, Lina Hudhud, Steib Anita, Hunyady Ágnes, **Horváth Ádám**, Kecskés Angéla, Borbély Éva, Hetényi Csaba, Pethő Gábor, Pintér Erika, Helyes Zsuzsanna. In silico, in vitro and in vivo pharmacodynamic characterization of novel analgesic drug candidate somatostatin sst4 receptor agonists. *Frontiers in Pharmacology*. 11 601887 (2021) <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.601887>

IF: 5,51

10.3. Kongresszusi poszter prezentációk

Horváth Ádám, Biró-Sütő Tünde, Sággy Éva, Payrits Maja, Helyes Zsuzsanna, Steib Anita, Pohóczky Krisztina, Szolcsányi János, Szőke Éva; Evidence for the in vivo analgesic effect of sphingomyelinase via lipid rafts; 16th Annual Conference of the Hungarian Neuroscience Society Hungarian Academy of Sciences, 2019. 01. 17-18., Debrecen

Horváth Ádám, Biró-Sütő Tünde, Sággy Éva, Payrits Maja, Helyes Zsuzsanna, Steib Anita, Pohóczky Krisztina, Szolcsányi János, Szőke Éva; Antinociceptív vizsgálatok: A szfingomielináz lipid raftokon keresztül kifejtett hatásai; Gyógyszerinnováció 2019 Konferencia, 2019. 04. 01-03., Gárdony

Horváth Ádám, Biró-Sütő Tünde, Sággy Éva, Payrits Maja, Helyes Zsuzsanna, Steib Anita, Pohóczky Krisztina, Szolcsányi János, Szőke Éva; Examination of the in vivo analgesic effect of sphingomyelinase in mice; 1st Pécs-Osijek PhD Symposium, 2019. 05. 10., Pécs

Biró-Sütő Tünde, **Horváth Ádám**, Payrits Maja, Sággy Éva, Skodáné-Földes Rita, Szánti-Pintér Eszter, Makkai Géza, Erostyák János, Helyes Zsuzsanna, Szőke Éva; Evidence for the in vivo analgesic effect of carboxamido steroids via lipid rafts; 11th Congress of The European Pain Federation EFIC, 2019. 09. 04-07., Valencia, Spanyolország

Szőke Éva, **Horváth Ádám**, Biró-Sütő Tünde, Sággy Éva, Payrits Maja, Steib Anita, Makkai Géza, Erostyák János, Helyes Zsuzsanna; In vitro and in vivo evidence for the role of sphingomyelin and lipid rafts in Ca²⁺-gating of the Transient Receptor Potential channels in sensory neurons; 11th Congress of The European Pain Federation EFIC, 2019. 09. 04-07., Valencia, Spanyolország

Horváth Ádám, Biró-Sütő Tünde, Kántás Boglárka, Payrits Maja, Helyes Zsuzsanna, Szőke Éva; Lipid rafts – novel approaches in the pain modulation?; 8th BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences, 2019. 10. 14-16., Izmir, Törökország

Kántás Boglárka, Szőke Éva, **Horváth Ádám**, Hunyady Ágnes, Bánhegyi Péter, Borbély Éva, Kéri György, Szolcsányi János, Pintér Erika; A small molecule somatostatin 4 receptor agonists is a novel analgesic drug candidate; 8th BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences, 2019. 10. 14-16., Izmir, Törökország

Horváth Ádám, Biró-Sütő Tünde, Kántás Boglárka, Payrits Maja, Erostyák János, Makkai Géza, Helyes Zsuzsanna, Szőke Éva; Lipid raftok – új lehetőség a fájdalomcsillapításban?; MOFT 2019, 2019. 11. 08-09., Szeged

Kántás Boglárka, Szőke Éva, **Horváth Ádám**, Bánhegyi Péter, Hunyady Ágnes, Borbély Éva, Kéri György, Szolcsányi János, Pintér Erika, Helyes Zsuzsanna; Új hatásmechanizmusú fájdalomcsillapító gyógyszerjelöltek vizsgálata egérmodellekben; MOFT 2019, 2019. 11. 08-09., Szeged

Horváth Ádám, Biró-Sütő Tünde, Kántás Boglárka, Payrits Maja, Erostyák János, Makkai Géza, Helyes Zsuzsanna, Szőke Éva; A sejtmembrán modifikálása – új megközelítés a fájdalom modulációjában; Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XVI., 2020. 09. 10-12., Debrecen (online)

Horváth Ádám, Biró-Sütő Tünde, Kántás Boglárka, Erostyák János, Skodáné-Földes Rita, Helyes Zsuzsanna, Szőke Éva; Evidence for the effect of lipid raft disruption in mouse model of pain with different mechanism; 11th International Symposium on Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection (ISCTICO), 2021. 10. 27-30, Pécs

Horváth Ádám, Steib Anita, Erostyák János, Helyes Zsuzsanna, Szőke Éva; Szfingolipidek komplex szerepének vizsgálata a sejtmembránon keresztüli fájdalomcsillapításban; MOFT 2021. évi Kongresszusa, 2021. 11. 05-06., Szeged

Horváth Ádám, Biró-Sütő Tünde, Kántás Boglárka, Payrits Maja, Erostyák János, Makkai Géza, Helyes Zsuzsanna, Szőke Éva; Neuronal membrane lipid raft modification might be a novel opportunity for pain management; 8th European virtual congress of pharmacology (EPHAR 2021), 2021. 12. 06-08., Prága, (online)

Horváth Ádám, Steib Anita, Erostyák János, Helyes Zsuzsanna, Szőke Éva; In vitro examination of the effect of lipid raft disruptors on different cell properties; International Neuroscience Meeting Budapest 2022 – IBRO Workshop; 2022. 01. 27-28., Budapest

Horváth Ádám, Steib Anita, Kántás Boglárka, Berenkei Gábor, Erostyák János, Nehr-Majoros Andrea, Helyes Zsuzsanna, Szőke Éva; A lipid raft diszrupció befolyásolja a sejtéletképességet, a membránfluiditást és a TRPM8 ioncsatorna aktivációt, 51. Membrán-Transzport Konferencia, 2022. 05. 17-20., Sümeg

Horváth Ádám, Kántás Boglárka, Berenkei Gábor, Erostyák János, Helyes Zsuzsanna, Szőke Éva; A lipid raft diszrupció hatása a membránfluidításra in vitro és a TRPM8 ioncsatorna aktivációjára in vivo; HUPHAR60 Gyógyszerkutatás, Innováció és Farmakokinetika Konferencia, 2022. 06. 07-09., Mátrafüred

10.4. Kongresszusi szóbeli prezentációk

Horváth Ádám, Biró-Sütő Tünde, Sághy Éva, Payrits Maja, Helyes Zsuzsanna, Steib Anita, Pohóczky Krisztina, Szolcsányi János, Szőke Éva; A szfingomielináz lipid raftokon keresztül kifejtett in vitro és in vivo hatásainak vizsgálata; XVI. PTE TTK Szentágothai János Protestáns Szakkollégiumi Konferencia és Hallgatói Verseny, 2019. 02. 15-16., Pécs

Horváth Ádám, Biró-Sütő Tünde, Sághy Éva, Payrits Maja, Helyes Zsuzsanna, Steib Anita, Pohóczky Krisztina, Szolcsányi János, Szőke Éva; A szfingomielináz lipid raft moduláló és antinociceptív hatásainak összefüggései; FAMÉ 2019, 2019. 06. 05-08., Budapest

Kántás Boglárka, Szőke Éva, **Horváth Ádám**, Bánhegyi Péter, Börzsei Rita, Hunyady Ágnes, Borbély Éva, Hetényi Csaba, Pintér Erika, Helyes Zsuzsanna; Pharmacological characterization of somatostatin 4 receptor agonists, as novel analgesic candidates; PhD Tudományos Napok 2020, 2020. 08. 31. – 09. 01., Budapest

Kántás Boglárka, Szőke Éva, **Horváth Ádám**, Bánhegyi Péter, Hunyady Ágnes, Borbély Éva, Kéri György, Szolcsányi János, Pintér Erika, Helyes Zsuzsanna; Új hatásmechanizmusú fájdalomcsillapító gyógyszerjelöltek hatástani vizsgálata egérmodellekben; Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XVI., 2020. 09. 10-12., Debrecen (online)

Horváth Ádám, Biró-Sütő Tünde, Kántás Boglárka, Payrits Maja, Erostyák János, Makkai Géza, Helyes Zsuzsanna, Szőke Éva; A sejtmembrán modifikálása – új megközelítés a fájdalom modulációjában; Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XVI., 2020. 09. 10-12., Debrecen (online)

Payrits Maja, **Horváth Ádám**, Biró-Sütő Tünde, Erostyák János, Makkai Géza, Pohóczky Krisztina, Kecskés Angéla, Kecskés Miklós, Szolcsányi János, Helyes Zsuzsanna, Szőke Éva; Resolvin D1 and D2 inhibit the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 and Ankyrin 1 ion channel activation on sensory neurons via lipid raft modification; LIVE-LONGER EFOP szakmai konferencia. 2020. 10. 16. Pécs (online)

Horváth Ádám, Biró-Sütő Tünde, Kántás Boglárka, Erostyák János, Skodáné-Földes Rita, Helyes Zsuzsanna, Szőke Éva; Lipid raft disruption as a novel approach in pain management; Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences (MEDPecs 2020), 2020. 10. 17., Pécs (online)

Horváth Ádám, Biró-Sütő Tünde, Kántás Boglárka, Payrits Maja, Erostyák János, Makkai Géza, Pohóczky Krisztina, Helyes Zsuzsanna, Szőke Éva; Lipid raftok komplex szerepének vizsgálata különböző fájdalommechanizmusokban; MOFT 2020. évi Kongresszusa, 2020. 11. 06-07., Szeged (online)

Horváth Ádám, Biró-Sütő Tünde, Kántás Boglárka, Payrits Maja, Erostyák János, Makkai Géza, Pohóczky Krisztina, Helyes Zsuzsanna, Szőke Éva; Is the cell membrane modification a novel possibility in the pain management?; FIBOK 2020, 2020. 11. 12., Debrecen (online)

Horváth Ádám, Biró-Sütő Tünde, Kántás Boglárka, Skodáné-Földes Rita, Helyes Zsuzsanna, Szőke Éva; Lipid raft disruptors exert antinociceptive effects in vivo; Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia 2020., 2020. 11. 27-28., Pécs (online)

Horváth Ádám, Kántás Boglárka, Steib Anita, Berenkei Gábor, Kerekeres Richárd; A lipid raftok módosításának komplex vizsgálata in vitro és in vivo; XIV. Clauder Ottó Emlékverseny; 2021. 11. 11-12., Budapest

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Szőke Évának, aki már az első találkozásunk alkalmával bizalmat szavazott nekem, és az elmúlt négy év során mind emberi, mind szakmai odaadásával és tanácsaival segítette a munkámat. Hálával tartozom Prof. Dr. Pintér Erikának a Gyógyszertudományok Doktori Iskola, valamint a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet vezetőjének munkám támogatásáért, valamint Prof. Dr. Helyes Zsuzsannának, aki szakmai tudásával, ötleteivel és a kutatás iránti feltétlen elhivatottságával támogatta a PhD tanulmányaimat. Köszönetet szeretnék mondani Skodáné Dr. Földes Rita tanárnőnek és munkacsoportjának a karboxamido-szteroid vegyület szintéziséért. Külön köszönettel tartozom Dr. Erostyák Jánosnak a fluoreszcens spektroszkópiai mérések során nyújtott segítségért, PhD hallgató társamnak Dr. Kántás Boglárkának, akivel szorosan együtt működünk az összes kísérletünk során, valamint Biró-Sütő Tündének, Önböli Gyuláné Dórinak és Disztl Cecíliának, akik asszisztensi munkájukkal járultak hozzá a kísérleteink sikerességéhez. A PhD tanulmányaimhoz nyújtott támogatásért hálával tartozom a Richter Gedeon Talentum Alapítványnak. Továbbá szeretném megköszönni a Farmakológiai s Farmakoterápiai Intézet minden munkatársának a támogatását és a mindennapok jó hangulatát. Végezetül szeretném megköszönni családom és párom támogatását, és PhD dolgozatomat szeretném néhai nagymamám emlékének ajánlani.



Antinociceptive Effects of Lipid Raft Disruptors, a Novel Carboxamido-Steroid and Methyl β -Cyclodextrin, in Mice by Inhibiting Transient Receptor Potential Vanilloid 1 and Ankyrin 1 Channel Activation

OPEN ACCESS

Edited by:

Peter Santha,
University of Szeged, Hungary

Reviewed by:

Janos Paloczi,
National Institutes of Health (NIH),
United States
Vincenzo Barrese,
University of Naples Federico II, Italy

*Correspondence:

Ádám Horváth
horvatadam7@gmail.com

† These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Clinical and Translational Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 05 May 2020

Accepted: 18 August 2020

Published: 23 September 2020

Citation:

Horváth Á, Biró-Sütő T, Kántás B,
Payrits M, Skoda-Földes R,
Szánti-Pintér E, Helyes Z and Szőke É
(2020) Antinociceptive Effects of Lipid
Raft Disruptors, a Novel
Carboxamido-Steroid and Methyl
 β -Cyclodextrin, in Mice by Inhibiting
Transient Receptor Potential Vanilloid
1 and Ankyrin 1 Channel Activation.
Front. Physiol. 11:559109.
doi: 10.3389/fphys.2020.559109

Ádám Horváth^{1,2*†}, Tünde Biró-Sütő^{1,2†}, Boglárka Kántás^{1,2}, Maja Payrits^{1,2},
Rita Skoda-Földes³, Eszter Szánti-Pintér³, Zsuzsanna Helyes^{1,2} and Éva Szőke^{1,2}

¹ Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary, ² János Szentágothai Research Centre and Centre for Neuroscience, University of Pécs, Pécs, Hungary, ³ Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry, University of Pannonia, Veszprém, Hungary

Transient Receptor Potential Vanilloid 1 and Ankyrin 1 (TRPV1, TRPA1) cation channels are expressed in nociceptive primary sensory neurons, and play an integrative role in pain processing and inflammatory functions. Lipid rafts are liquid-ordered plasma membrane microdomains rich in cholesterol, sphingomyelin, and gangliosides. We earlier proved that lipid raft disintegration by cholesterol depletion using a novel carboxamido-steroid compound (C1) and methyl β -cyclodextrin (MCD) significantly and concentration-dependently inhibit TRPV1 and TRPA1 activation in primary sensory neurons and receptor-expressing cell lines. Here we investigated the effects of C1 compared to MCD in mouse pain models of different mechanisms. Both C1 and MCD significantly decreased the number of the TRPV1 activation (capsaicin)-induced nocifensive eye-wiping movements in the first hour by 45% and 32%, respectively, and C1 also in the second hour by 26%. Furthermore, C1 significantly decreased the TRPV1 stimulation (resiniferatoxin)-evoked mechanical hyperalgesia involving central sensitization processes, while its inhibitory effect on thermal allodynia was not statistically significant. In contrast, MCD did not affect these resiniferatoxin-evoked nocifensive responses. Both C1 and MCD had inhibitory action on TRPA1 activation (formalin)-induced acute nocifensive reactions (paw liftings, lickings, holdings, and shakings) in the second, neurogenic inflammatory phase by 36% and 51%, respectively. These are the first *in vivo* data showing that our novel lipid raft disruptor carboxamido-steroid compound exerts antinociceptive and antihyperalgesic effects by inhibiting

TRPV1 and TRPA1 ion channel activation similarly to MCD, but in 150-fold lower concentrations. It is concluded that C1 is a useful experimental tool to investigate the effects of cholesterol depletion in animal models, and it also might open novel analgesic drug developmental perspectives.

Keywords: inflammation, lipid rafts, methyl β -cyclodextrin, nerve terminal, pain, sensory neuron, steroid, Transient Receptor Potential channel

INTRODUCTION

Transient Receptor Potential (TRP) Vanilloid 1 and Ankyrin 1 (TRPV1 and TRPA1) cation channels are multimeric receptors activated by a variety of inflammatory mediators and tissue irritants, temperature changes and mechanical stimuli besides the classical exogenous agonists such as capsaicin (CAPS), resiniferatoxin (RTX) and formaldehyde, allyl-isothiocyanate (in mustard oil), respectively (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002; Reid and Flonta, 2002; Grimm et al., 2003, 2005; Lee et al., 2003; Bandell et al., 2004; Corey et al., 2004; Jordt et al., 2004; Macpherson et al., 2005, 2007; McNamara et al., 2007; Trevisani et al., 2007; Wagner et al., 2008; Majeed et al., 2010; Vilceanu and Stucky, 2010; Vriens et al., 2011, 2014; Bautista et al., 2013; Drews et al., 2014; Oberwinkler and Philipp, 2014). TRPV1 and TRPA1 are often co-localized on the CAPS-sensitive peptidergic sensory neurons and play key regulatory roles in pain and inflammation (Szolcsányi, 2004; Salas et al., 2009). Pro-inflammatory neuropeptides such as Substance P and calcitonin gene-related peptide released from the activated CAPS-sensitive sensory nerve fibers evoke vasodilation, plasma protein extravasation and inflammatory cells activation in the innervated area called neurogenic inflammation, as well as nociceptor sensitization (Helyes et al., 2003a, 2009; Szolcsányi, 2004). Therefore, both TRPV1 and TRPA1 have been in the focus of analgesic and anti-inflammatory drug development, especially for the treatment of chronic neuropathic pain and inflammatory diseases with neurogenic inflammatory components (chronic obstructive pulmonary diseases, psoriasis, arthritis, inflammatory bowel diseases) (Moran et al., 2011; Kaneko and Szallasi, 2014; Nilius and Szallasi, 2014). The presently available drugs do not provide satisfactory pain relief in most cases or induce severe side effects after long-term use (Botz et al., 2017). Great efforts have been put into the development of TRPV1 antagonists which proved to be very effective in both preclinical and phase II and III clinical trials, but due to their hyperthermic side effects they could not be registered in the clinical practice (Helyes et al., 2003b; Lee et al., 2015). TRPA1 is also considered to

be a promising analgesic target based on experimental and human studies which seem to be free of severe side effects (Romanovsky et al., 2009; Botz et al., 2017). These data clearly suggest the drug developmental potential of TRPV1 and TRPA1 blockade, therefore alternative mechanisms in addition to the direct antagonism have been proposed as promising inhibitors options (Ferrari and Levine, 2015; Sághy et al., 2015, 2018; Lin et al., 2019).

Recent results of extensive lipid raft research in the last two decades have had a great impact on cell biology and pharmacology. Lipid rafts are specialized microdomains in the plasma membrane rich in cholesterol, sphingomyelins and gangliosides (Simons and Ikonen, 1997). Several receptors, ion channels and signaling molecules including TRPV1 and TRPA1 ion channels are located in lipid rafts and disruption of these membrane regions affects their functions (Liu et al., 2006; Morenilla-Palao et al., 2009; Szőke et al., 2010; Sághy et al., 2015). However, data are controversial about the outcomes of lipid raft modulation on TRP channels. Although several *in vitro* data show that lipid raft decomposition inhibits TRP channel opening, there are only two recent *in vivo* evidence. Methyl β -cyclodextrin (MCD)-induced membrane cholesterol depletion led to antinociception in the RTX-evoked mononeuropathy model via phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) hydrolysis (Lin et al., 2019) and significantly attenuated the prostaglandin E₂ (PGE₂)-evoked mechanical hyperalgesia in rats (Ferrari and Levine, 2015).

Several endogenous steroids have been described to inhibit TRPV1. Dehydroepiandrosterone (DHEA) is able to decrease CAPS-evoked currents in primary sensory neurons (Chen et al., 2004). However, it is not clear if DHEA bind directly to the CAPS-binding domain or it is an allosteric modulator of TRPV1. The neurosteroid pregnenolone sulfate (PS) has a variety of neuropharmacological actions including glycinergic synaptic transmission in the pain pathway. PS, pregnanolone, pregnanolone sulfate, progesterone or dihydrotestosterone administration in extracellular way significantly inhibited TRP Canonical 5 (TRPC5) channel activation within 1–2 min, 17 β -estradiol (E₂) and dehydroepiandrosterone sulfate had weak inhibitory effects. TRPC5 channels are able to direct stereo-selective steroid modulation quickly, and it is lead to channel inhibition (Majeed et al., 2011). We published earlier that our novel synthetic carboxamido-steroid compound (C1) decreased activation of TRP channels located on primary sensory neurons, such as TRPV1, TRPA1, TRP Melastatin 3 (TRPM3), and TRP Melastatin 8 (TRPM8). Furthermore, we provided the first evidence and the presence and the position of the carboxamido group was important for this

Abbreviations: C1, carboxamido-steroid compound; CAPS, capsaicin; CRAC, Cholesterol Recognition/interaction Amino acid Consensus; DHEA, dehydroepiandrosterone; DRG, dorsal root ganglion; E₂, 17- β estradiol; MCD, methyl β -cyclodextrin; PGE₂, prostaglandin E₂; PI(4,5)P₂, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PS, pregnenolone sulfate; RAMEB, random methylated β -cyclodextrins; RTX, resiniferatoxin; TrkA, tropomyosin-related kinase A; TRP, Transient Receptor Potential; TRPA1, Transient Receptor Potential Ankyrin 1; TRPC5, Transient Receptor Potential Canonical 5; TRPM3, Transient Receptor Potential Melastatin 3; TRPM8, Transient Receptor Potential Melastatin 8; TRPV1, Transient Receptor Potential Vanilloid 1.

action mediated by cholesterol depletion from the plasma membrane. This effect was similar to that of MCD, but in a much lower, 1000-fold concentration (Szánti-Pintér et al., 2015; Sághy et al., 2018).

Based on these data obtained on primary sensory neuronal cultures here we investigated the effects of C1 compound in mouse pain models of different mechanisms related to TRPV1 and TRPA1 activation in comparison with MCD.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Ethics

Twelve to sixteen week-old male C57BL/6 mice were used to test CAPS-evoked nocifensive reactions, and NMRI mice of the same age and sex in the formalin-, and RTX-induced models. The animals were kept in standard plastic cages at 24–25°C, under a 12–12 h light-dark cycle and provided with standard rodent chow and water *ad libitum* in the Laboratory Animal House of the Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Pécs. All experimental procedures were carried out according to the 1998/XXVIII Act of the Hungarian Parliament on Animal Protection and Consideration Decree of Scientific Procedures of Animal Experiments (243/1988). The studies were approved by the Ethics Committee on Animal Research of Pécs University according to the Ethical Codex of Animal Experiments and license was given (license No.: BAI/35/702-6/2018.).

Synthesis of Steroid Compound C1

The steroid compound C1 was synthesized by a method, which was described earlier in details (Horváth et al., 2011; Szánti-Pintér et al., 2011, 2015). In brief, the 16-keto-18-nor-13 α -steroid was obtained via an unusual Wagner–Meerwein rearrangement of 16 α ,17 α -epoxy-5 α -androstane in the presence of an imidazolium-based ionic liquid (Horváth et al., 2011). The derivatization of the unnatural steroid was performed by Barton's methodology leading to an iodoalkene mixture (Szánti-Pintér et al., 2015). The iodoalkene mixture was converted to N-(prop-2-ynyl)-carboxamides via a palladium-catalyzed aminocarbonylation reaction and after a column chromatography, C1 was obtained in pure form.

CAPS-Evoked Acute Chemonocifensive Reaction

The effects of C1 and MCD compared to the saline control were investigated on acute chemonociception, 30 μ g/ml CAPS (20 μ l) was instilled in the right eye of the mice. Local pretreatments (20 μ l) with 100 μ M C1 or 15 mM MCD were performed 30 min before the test. CAPS-induced eye-wiping movements with the forelegs were counted during 1 min, as previously described (Szolcsányi et al., 1975; Szöke et al., 2002). We counted only the one-leg movements, washing- or other two-hand movements were excluded. CAPS instillation was repeated 2 and 3 h after its first administration.

RTX-Induced Thermal Allodynia and Mechanical Hyperalgesia

Resiniferatoxin (0.1 μ g/ml, 20 μ l, ultrapotent TRPV1 agonist) was injected intraplantarly into right hindpaws. RTX induces an acute neurogenic inflammation with rapid development of thermal allodynia due to peripheral sensitization, and later mechanical hyperalgesia due to both peripheral and central mechanisms (Meyer and Campbell, 1981; Pan et al., 2003). Control thermo- and mechanonociceptive thresholds were measured on two consecutive days before the experiment, which were used for self-control comparisons. Intraplantar pretreatments (20 μ l) with 100 μ M or 500 μ M C1 and 15 mM MCD were performed 30 min before the RTX administration, which evokes a short acute nocifensive reaction of paw licking, biting, lifting or shaking. The thermonociceptive threshold was measured by an increasing temperature Hot Plate (IITC Life Science, Woodland Hills, CA, United States) 10, 20, and 30 min after RTX injection, and the mechanical hyperalgesia was investigated by Dynamic Plantar Aesthesiometer (DPA, Ugo Basile, Italy) 30, 60, and 90 min after RTX administration, as described earlier (Almási et al., 2003; Payrits et al., 2017; Kántás et al., 2019).

Formalin-Evoked Acute Nocifensive Behavior

Intraplantarly injected formalin (20 μ l, 2.5%) immediately induced nocifensive reactions. The duration of hindpaw licking, lifting, shaking and holding in an elevated position were measured between 0 and 5 min (first phase). It is related to direct chemical stimulation of nociceptors mainly via the TRPA1 receptor. After a resting period (ca. 10–15 min), the duration of the nocifensive behaviors was measured between 20 and 45 min (second phase). This is due to neurogenic inflammatory mechanisms (Tjølsen et al., 1992). Intraplantar pretreatments (20 μ l) with 100 μ M C1 or 15 mM MCD were performed 30 min before formalin administration.

Drugs and Chemicals

Methyl β -cyclodextrin (Sigma, St. Louis, MO, United States) was dissolved in saline to reach final concentration of 15 mM (500 mg/kg). C1 was dissolved in dimethyl sulfoxide to obtain a 10 mM stock solution. Further dilution was made with saline to reach final concentrations of 100 μ M (850 μ g/kg) or 500 μ M (4.25 mg/kg). CAPS from Sigma was diluted with saline from a 10 mg/ml stock solution of 10% ethanol, 10% Tween 80 in saline to reach final concentration of 30 μ g/ml. RTX (Sigma) was dissolved in ethanol to yield a 1 mg/ml stock solution, and further diluted with saline to reach final concentration of 0.1 μ g/ml. Formalin was diluted with phosphate-buffered saline from a 6% formaldehyde stock solution (Molar Inc., Hungary).

Statistical Analysis

All data are the means \pm SEM of six animals per group in the CAPS-evoked eye wiping test and formalin test, and 12–20 animals per group in the RTX-induced thermal allodynia and mechanical hyperalgesia model. Statistical analysis was

performed by Two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons *post hoc* test, in all cases $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

C1 and MCD Reduce the Number of CAPS-Evoked Eye-Wiping Movements

The number of CAPS-evoked eye-wipings in the 1st, 2nd, and 3rd h in the saline-pretreated group were 42.0 ± 1.9 ; 33.7 ± 1.8 ; 28.0 ± 3.3 , respectively. In contrast, the corresponding values in the C1-pretreated group were: 23.0 ± 4.2 ; 23.0 ± 3.8 ; 23.7 ± 3.5 (Figure 1A). In case of MCD pretreatment, the number of CAPS-evoked wiping in the saline-pretreated control animals were 32.2 ± 3.9 ; 27.2 ± 2.1 and 26.5 ± 2.2 after 1st, 2nd, and 3rd CAPS instillation. MCD-pretreated animals showed less of eye-wipings with the following results: 23.8 ± 2.7 ; 24.2 ± 3.3 ; 22.7 ± 2.7 (Figure 1B).

In both cases slightly decreasing response to CAPS was observed due to CAPS-evoked desensitization of the TRPV1 receptor. C1 significantly and gradually decreased the number of eye-wipings both in the 1st and 2nd h, while MCD exerted significant effect only in the 1st h.

C1 and MCD Do Not Influence RTX-Induced Thermal Allodynia

The baseline heat threshold values of untreated mice were between 44°C and 49°C . RTX-induced $9.5\text{--}16.3 \pm 2.3\text{--}3.1\%$; $9.1\text{--}9.6 \pm 2.3\text{--}3.2\%$ and $4.3\text{--}5.3 \pm 1.4\text{--}1.6\%$ ($39.0\text{--}41.9 \pm 1.1\text{--}1.5^\circ\text{C}$; $41.8\text{--}42.3 \pm 0.8\text{--}1.4^\circ\text{C}$; $43.9\text{--}44.5 \pm 0.6\text{--}1.0^\circ\text{C}$) drop of the thermoneociceptive threshold 10, 20, and 30 min after its intraplantar injection in the saline-pretreated control groups. The corresponding values were $11.6 \pm 2.3\%$ ($40.7 \pm 1.1^\circ\text{C}$); $3.3 \pm 1.6\%$ ($43.9 \pm 0.9^\circ\text{C}$); $3.8 \pm 1.6\%$ ($47.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$) for $100 \mu\text{M}$ C1, $14.5 \pm 1.8\%$ ($39.7 \pm 0.9^\circ\text{C}$); 6.6 ± 1.4 ($43.3 \pm 0.6^\circ\text{C}$); $0.3 \pm 1.7\%$ ($46.5 \pm 0.6^\circ\text{C}$) for $500 \mu\text{M}$ C1 and $8.3 \pm 2.0\%$ ($42.4 \pm 1.0^\circ\text{C}$); $7.8 \pm 0.9\%$ ($42.6 \pm 0.3^\circ\text{C}$); $5.8 \pm 2.1\%$ ($43.5 \pm 1.2^\circ\text{C}$) for 15 mM MCD.

Neither C1 nor MCD altered the RTX-induced thermal allodynia (Figures 2A,B).

C1 Diminishes RTX-Induced Mechanical Hyperalgesia

The basal mechanonociceptive thresholds of the intact mouse paw were between 8 and 10 g. RTX-evoked drop of the mechanonociceptive threshold values were $43.9\text{--}44.5 \pm 3.2\text{--}6.2\%$; $37.3\text{--}37.9 \pm 3.9\text{--}8.1\%$ and $26.9\text{--}39.5 \pm 3.0\text{--}4.2\%$ ($5.0\text{--}5.4 \pm 0.3\text{--}0.6 \text{ g}$; $5.6\text{--}6.0 \pm 0.4\text{--}0.7 \text{ g}$; $5.5\text{--}7.0 \pm 0.2\text{--}0.4 \text{ g}$) 30, 60, and 90 min after the injection in the saline pretreated control groups. The corresponding values were $30.0 \pm 5.2\%$ ($6.5 \pm 0.4 \text{ g}$); $20.1 \pm 5.0\%$ ($7.4 \pm 0.4 \text{ g}$); $10.4 \pm 4.8\%$ ($8.3 \pm 0.4 \text{ g}$) for $100 \mu\text{M}$ C1, $19.0 \pm 3.1\%$ ($7.8 \pm 0.3 \text{ g}$); $16.6 \pm 2.9\%$ ($8.0 \pm 0.3 \text{ g}$); $14.3 \pm 3.0\%$ ($8.2 \pm 0.8 \text{ g}$) for $500 \mu\text{M}$ C1 and $36.6 \pm 6.4\%$ ($5.4 \pm 0.5 \text{ g}$); $43.4 \pm 3.4\%$ ($4.9 \pm 0.3 \text{ g}$); $29.7 \pm 6.4\%$ ($6.0 \pm 0.5 \text{ g}$) for 15 mM MCD.

Both $100 \mu\text{M}$ and $500 \mu\text{M}$ of C1 alleviated the RTX-induced mechanical hyperalgesia, but MCD had no effect (Figures 3A,B).

C1 and MCD Alleviate Formalin-Evoked Acute Nocifensive Behaviors

The durations of formalin-evoked acute nocifensive behaviors in the saline-pretreated control group were $179.5 \pm 16.0 \text{ s}$ and $331.5 \pm 45.0 \text{ s}$ in the first and second phases, respectively. In the C1 pretreated animals these values were $144.2 \pm 18.5 \text{ s}$ and $212.2 \pm 31.5 \text{ s}$ (Figure 4A). In case of MCD pretreatment, the nocifensive behaviors durations in the saline control group were $173.9 \pm 17.6 \text{ s}$ and $330.5 \pm 49.2 \text{ s}$ in the two phases, respectively. Compared to the MCD-pretreated group, the corresponding values were $155.9 \pm 5.1 \text{ s}$ and $163.2 \pm 31.3 \text{ s}$ (Figure 4B).

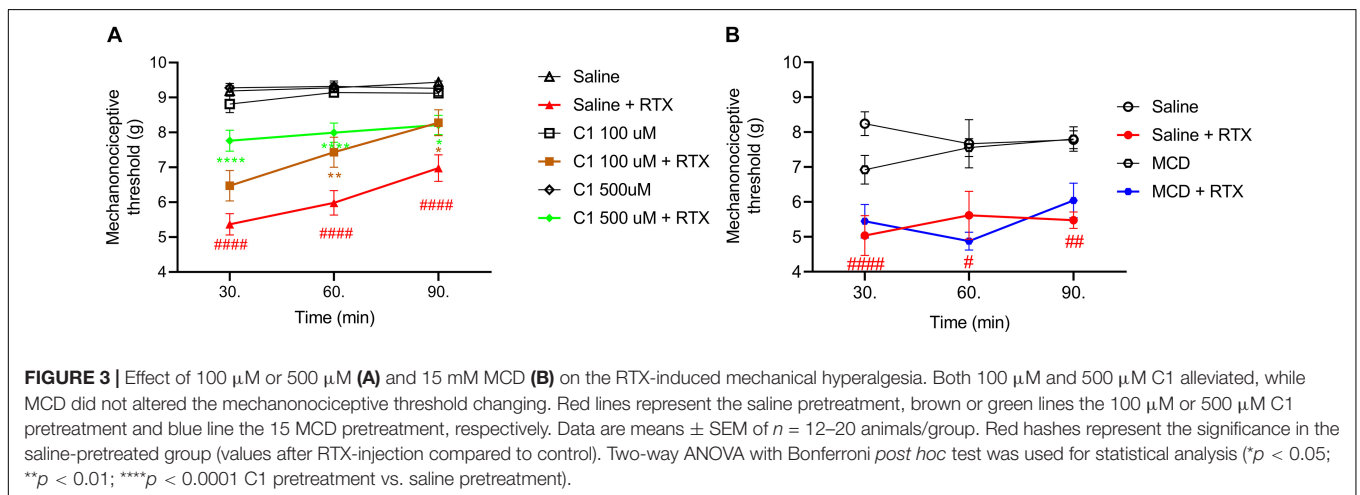
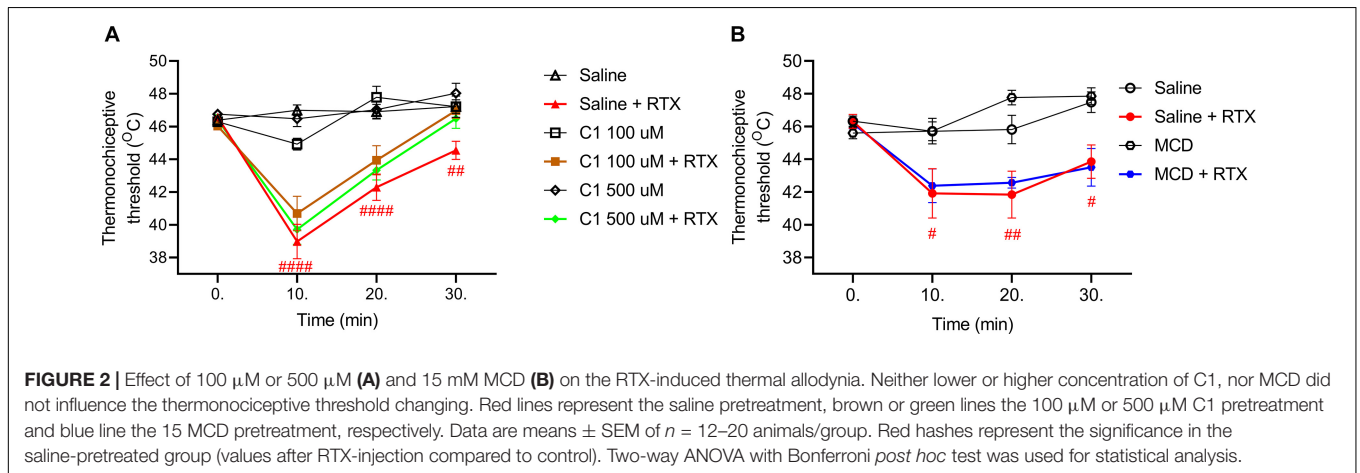
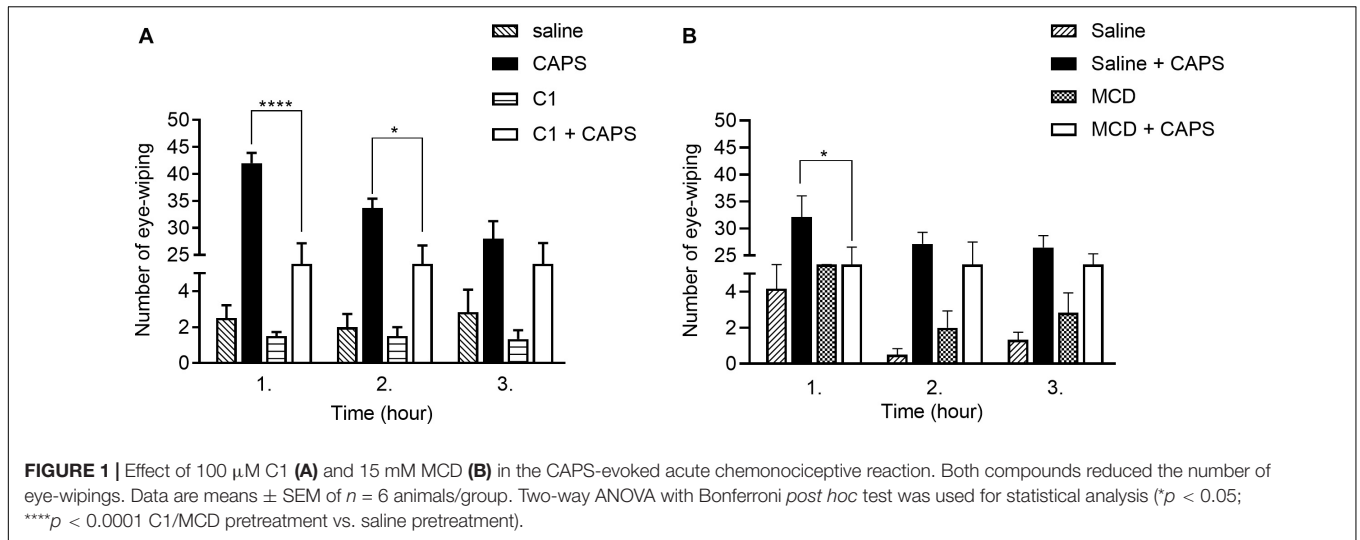
Neither C1 nor MCD modified the nocifensive behaviors in the first phase related to direct chemical activation of TRPA1 receptors, but both compounds significantly decreased the pain reactions in the second phase resulting from acute neurogenic inflammation.

DISCUSSION

We present here the analgesic effect of lipid raft decomposition depleting cholesterol by C1 and MCD (Szánti-Pintér et al., 2015; Sághy et al., 2018). We demonstrated that C1 and MCD diminished TRPV1 and TRPA1 activation-induced acute nocifensive behaviors, furthermore, C1 inhibited the development of TRPV1 stimulation-evoked mechanical hyperalgesia.

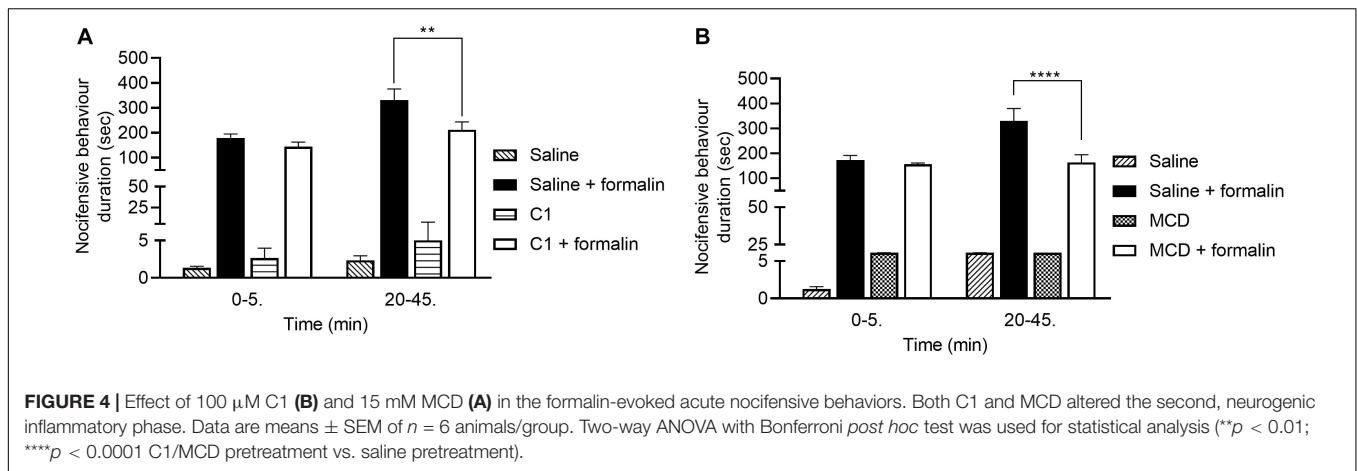
Both C1 and MCD significantly diminished the number of CAPS instillation-induced eye-wiping movements in the 1st h by 45 and 32%, respectively, and C1 also in the 2nd h by 26%. We observed a slightly decreasing response in the 2nd and 3rd h to CAPS due to desensitization of TRPV1 receptor (Sharma et al., 2013). Furthermore, C1 significantly decreased RTX-induced mechanical hyperalgesia involving central sensitization processes as well, while its inhibitory effect on thermal allodynia induced predominantly by peripheral sensitization mechanisms (Pan et al., 2003) was not statistically significant. In contrast MCD did not affect these RTX-induced nocifensive responses. Both compounds had inhibitory action on formalin-evoked acute neurogenic inflammatory nocifensive reactions (paw liftings, lickings, holdings, and shakings) in the second, neurogenic inflammatory phase by 36 and 51%, respectively.

These novel *in vivo* results are well supported by our previous *in vitro* findings showing that C1 and MCD significantly and concentration-dependently inhibit TRPV1 and TRPA1 receptor activation both on primary sensory neuronal cultures and receptor-expressing cell line (Szöke et al., 2010; Szánti-Pintér et al., 2015; Sághy et al., 2015, 2018). We have previously proved by filipin staining and fluorescence spectroscopy that C1 similarly to MCD depleted cholesterol from the plasma membrane of sensory neurons, and therefore, they are both considered to be lipid raft disruptors (Sághy et al., 2018). Furthermore, we described that the presence and the



position of the carboxamido group on the steroidal skeleton are substantial for TRP channel inhibition. The importance of stereoselectivity was emphasized for the inhibitory effects of steroids on the TRPC5 cation channel. Progesterone and

pregnanolone diminished TRPC5 channel function, while the stereo-isomer of pregnanolone, pregnenolone and a progesterone metabolite allopregnanolone had no inhibitory effects. It is suggested, that stereo-isomerism due to a minimal



structural change might be sufficient to alter the biological effect (Majeed et al., 2011). CAPS-induced currents in sensory neurons were decreased by DHEA, but the molecular mechanism is unclear. Although the authors suggested its direct effects on the CAPS-binding domain or an allosteric modulation its action on the lipid rafts surrounding the TRPV1 is also possible (Chen et al., 2004). In a previous study we demonstrated that E2 incubation anticipated the TRPV1 desensitization via the tropomyosin-related kinase A (TrkA) receptor. We provided *in vivo* and *in vitro* evidence for E2-induced TRPV1 receptor sensitization mediated by TrkA via E2-evoked genomic and non-genomic mechanisms (Payrits et al., 2017). Cholesterol depletion by MCD decreased the CAPS-evoked currents in dorsal root ganglion (DRG) primary sensory neurons (Liu et al., 2006). In contrast, MCD did not influence the heat-evoked responses on TRPV1-transfected *Xenopus laevis* oocytes (Liu et al., 2003) or ³H-RTX binding to TRPV1 receptors on rat C6 glioma cells (Bari et al., 2005). Cholesterol enrichment in isolated membrane segments can modulate the temperature threshold for TRPV1 activation through specific Cholesterol Recognition/interaction Amino acid Consensus (CRAC) motifs (Morales-Lázaro and Rosenbaum, 2019). Increased membrane cholesterol, but not its diastereoisomer epicholesterol addition, inhibited CAPS-, heat- and voltage-induced TRPV1 currents (Picazo-Juárez et al., 2011). These results were also supported by structural studies of CRACs (Levitan et al., 2014; Saha et al., 2017).

Although there are several *in vitro* evidence that lipid raft disruption affected TRP channel activation (Szöke et al., 2010; Sággy et al., 2015), there are only sporadic, recent *in vivo* reports. MCD-related cholesterol depletion induced antinociception in RTX-induced mononeuropathy through PI(4,5)P2 hydrolysis in mice (Lin et al., 2019). Intraplantar injection of MCD attenuated the PGE2-, but not cyclopentyladenosine-evoked mechanical hyperalgesia. It is suggest that the development of PGE2-evoked hyperalgesia is closely related to lipid raft integrity (Ferrari and Levine, 2015). Both local and systemic administration of random methylated β-cyclodextrins (RAMEB) attenuated complete Freund's adjuvant-induced thermal allodynia and mechanical hyperalgesia in rats. RAMEB might

capture the prostaglandin content and then decrease the inflammatory pain which might be a novel anti-inflammatory and analgesic tool (Sauer et al., 2017). Intraplantar injection of another components of lipid rafts, the ganglioside GT1b, produced nociceptive responses and enhanced formalin-induced nocifensive reactions. On the other hand, intraplantar injection of sialidase, which cleaves sialyl residues from gangliosides, attenuated these responses (Watanabe et al., 2011; Sántha et al., 2020). The flavanone isosakuranetin blocked PS-induced Ca²⁺-influx in DRG neurons and significantly attenuated the noxious heat- and PS-induced pain sensation in mice (Straub et al., 2013).

The present *in vivo* data provide the first evidence that the novel C1 compound modifying lipid rafts surrounding the TRPV1 and TRPA1 ion channels exerts antinociceptive and antihyperalgesic effects. The maximal inhibitory effect observed in both TRPV1 and TRPA1 activation-induced nocifensive tests were similar to that of MCD, but in 150-fold lower concentrations. Furthermore, C1 proved to be effective also on RTX-evoked mechanical hyperalgesia that was not affected by MCD. However, despite the well-established lipid rafts disrupting abilities of both C1 and MCD (Szöke et al., 2010; Sággy et al., 2015, 2018), their direct inhibitory actions on the TRPV1 and TRPA1 ion channel activation cannot be excluded.

We conclude that the novel C1 compound is a useful experimental tool to investigate the effects of cholesterol depletion in animal models, and it also might open novel opportunities for analgesic drug development.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets presented in this study are included in the article/supplementary material.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by the Ethics Committee on Animal Research, University of Pécs.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

ÉS and JSz contributed to the conceptualization. MP, ÁH, BK, TB-S, ESP, and RS-F contributed to the methodology. ÁH and TB-S contributed to the formal analysis, writing – original draft preparation, visualization, and project administration. ÁH, BK, TB-S, and MP contributed to the investigation. ZH and ÉS contributed to the resources, writing – review and editing, supervision, and funding acquisition. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by the National Brain Research Program 2017-1.2.1-NKP -2017-00002 (NAP-2; Chronic Pain Research Group), the Hungarian National Research, Development and Innovation Office (OTKA K120014), Hungarian National Grants GINOP-2.3.2-15-2016-00050,

EFOP-3.6.2-16-2017-00006, and EFOP-3.6.2-16-2017-00008), as well as 17886-4/23018/FEKUTSTRAT excellence grant. MP was supported by the New National Excellence Program of the Ministry of Human Capacities ÚNKP-18-4, ÉS by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences and by the New National Excellence Program of the Ministry of Human Capacities ÚNKP-18-4, and ÚNKP-19-4 New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology grant.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dóra Ömböli for her expert technical assistance, and the Late Prof. János Szolcsányi for his expert advices during the experimental procedures. Prof. Szolcsányi passed away during the course of this study, and this paper is dedicated to his memory.

REFERENCES

- Almási, R., Pethő, G., Bölskei, K., and Szolcsányi, J. (2003). Effect of resiniferatoxin on the noxious heat threshold temperature in the rat: a novel heat allodynia model sensitive to analgesics. *Br. J. Pharmacol.* 139, 49–58. doi: 10.1038/sj.bjp.0705234
- Bandell, M., Story, G. M., Hwang, S. W., Viswanath, V., Eid, S. R., Petrus, M. J., et al. (2004). Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 41, 849–857. doi: 10.1016/S0896-6273(04)00150-3
- Bari, M., Battista, N., Fezza, F., Finazzi-Agrò, A., and Maccarrone, M. (2005). Lipid rafts control signaling of type-1 cannabinoid receptors in neuronal cells: implications for anandamide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 280, 12212–12220. doi: 10.1074/jbc.M411642200
- Bautista, D. M., Pellegrino, M., and Tsunozaki, M. (2013). TRPA1: a gatekeeper for inflammation. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 181–200. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183811
- Botz, B., Bölskei, K., and Helyes, Z. (2017). Challenges to develop novel anti-inflammatory and analgesic drugs: novel anti-inflammatory and analgesic drugs. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 9:e1427. doi: 10.1002/wnan.1427
- Chen, S.-C., Chang, T.-J., and Wu, F.-S. (2004). Competitive inhibition of the capsaicin receptor-mediated current by dehydroepiandrosterone in rat dorsal root ganglion neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311, 529–536. doi: 10.1124/jpet.104.069096
- Corey, D. P., García-Añoveros, J., Holt, J. R., Kwan, K. Y., Lin, S.-Y., Vollrath, M. A., et al. (2004). TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature* 432, 723–730. doi: 10.1038/nature03066
- Drews, A., Mohr, F., Rizun, O., Wagner, T. F. J., Dembla, S., Rudolph, S., et al. (2014). Structural requirements of steroidal agonists of transient receptor potential melastatin 3 (TRPM3) cation channels: structural requirements of TRPM3 agonists. *Br. J. Pharmacol.* 171, 1019–1032. doi: 10.1111/bph.12521
- Ferrari, L. F., and Levine, J. D. (2015). Plasma membrane mechanisms in a preclinical rat model of chronic pain. *J. Pain* 16, 60–66. doi: 10.1016/j.jpain.2014.10.007
- Grimm, C., Kraft, R., Sauerbruch, S., Schultz, G., and Harteneck, C. (2003). Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3. *J. Biol. Chem.* 278, 21493–21501. doi: 10.1074/jbc.M300945200
- Grimm, C., Kraft, R., Schultz, G., and Harteneck, C. (2005). Activation of the melastatin-related cation channel TRPM3 by d-erythro-Sphingosine. *Mol. Pharmacol.* 67, 798–805. doi: 10.1124/mol.104.006734
- Helyes, Z., Németh, J., Thán, M., Bölskei, K., Pintér, E., and Szolcsányi, J. (2003a). Inhibitory effect of anandamide on resiniferatoxin-induced sensory neuropeptide release in vivo and neuropathic hyperalgesia in the rat. *Life Sci.* 73, 2345–2353. doi: 10.1016/S0024-3205(03)00651-9
- Helyes, Z., Pinter, E., Nemeth, J., and Szolcsanyi, J. (2003b). Pharmacological targets for the inhibition of neurogenic inflammation. *Curr. Med. Chem.* 2, 191–218. doi: 10.2174/1568014033483806
- Helyes, Z., Pinter, E., Sandor, K., Elekes, K., Banvolgyi, A., Keszthelyi, D., et al. (2009). Impaired defense mechanism against inflammation, hyperalgesia, and airway hyperreactivity in somatostatin 4 receptor gene-deleted mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 13088–13093. doi: 10.1073/pnas.0900681106
- Horváth, A., Szájli, Á, Kiss, R., Kóti, J., Mahó, S., and Skoda-Földes, R. (2011). Ionic liquid-promoted wagner-meerwein rearrangement of 16 α ,17 α -Epoxyandrostanes and 16 α ,17 α -Epoxyestranses. *J. Org. Chem.* 76, 6048–6056. doi: 10.1021/jo2006285
- Jordt, S.-E., Bautista, D. M., Chuang, H., McKemy, D. D., Zygmunt, P. M., Högestätt, E. D., et al. (2004). Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427, 260–265. doi: 10.1038/nature02282
- Kaneko, Y., and Szallasi, A. (2014). Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective: clinical perspective on TRPs. *Br. J. Pharmacol.* 171, 2474–2507. doi: 10.1111/bph.12414
- Kántás, B., Börzsei, R., Szőke, É, Bánhegyi, P., Horváth, Á, Hunyady, Á, et al. (2019). Novel drug-like somatostatin receptor 4 agonists are potential analgesics for neuropathic pain. *Int. J. Mol. Sci.* 20:6245. doi: 10.3390/ijms20246245
- Lee, N., Chen, J., Sun, L., Wu, S., Gray, K. R., Rich, A., et al. (2003). Expression and characterization of human transient receptor potential melastatin 3 (hTRPM3). *J. Biol. Chem.* 278, 20890–20897. doi: 10.1074/jbc.M211232200
- Lee, Y., Hong, S., Cui, M., Sharma, P. K., Lee, J., and Choi, S. (2015). Transient receptor potential vanilloid type 1 antagonists: a patent review (2011 – 2014). *Expert Opin. Ther. Pat.* 25, 291–318. doi: 10.1517/13543776.2015.1008449
- Levitán, I., Singh, D. K., and Rosenhouse-Dantsker, A. (2014). Cholesterol binding to ion channels. *Front. Physiol.* 5:65. doi: 10.3389/fphys.2014.00065
- Lin, C.-L., Chang, C.-H., Chang, Y.-S., Lu, S.-C., and Hsieh, Y.-L. (2019). Treatment with methyl- β -cyclodextrin prevents mechanical allodynia in resiniferatoxin neuropathy in a mouse model. *Biol. Open* 8:bio039511. doi: 10.1242/bio.039511
- Liu, B., Hui, K., and Qin, F. (2003). Thermodynamics of heat activation of single capsaicin ion channels VR1. *Biophys. J.* 85, 2988–3006. doi: 10.1016/S0006-3495(03)74719-5
- Liu, M., Huang, W., Wu, D., and Priestley, J. V. (2006). TRPV1, but not P2X₃, requires cholesterol for its function and membrane expression in rat nociceptors. *Eur. J. Neurosci.* 24, 1–6. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04889.x

- Macpherson, L. J., Dubin, A. E., Evans, M. J., Marr, F., Schultz, P. G., Cravatt, B. F., et al. (2007). Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature* 445, 541–545. doi: 10.1038/nature05544
- Macpherson, L. J., Geierstanger, B. H., Viswanath, V., Bandell, M., Eid, S. R., Hwang, S., et al. (2005). The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to Allicin. *Curr. Biol.* 15, 929–934. doi: 10.1016/j.cub.2005.04.018
- Majeed, Y., Agarwal, A., Naylor, J., Seymour, V., Jiang, S., Muraki, K., et al. (2010). Cis-isomerism and other chemical requirements of steroidal agonists and partial agonists acting at TRPM3 channels: TRPM3 steroid stereo-selectivity. *Br. J. Pharmacol.* 161, 430–441. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00892.x
- Majeed, Y., Amer, M., Agarwal, A., McKeown, L., Porter, K., O'Regan, D., et al. (2011). Stereoselective inhibition of transient receptor potential TRPC5 cation channels by neuroactive steroids: TRPC5 inhibition by steroids. *Br. J. Pharmacol.* 162, 1509–1520. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.01136.x
- McKemy, D. D., Neuhauser, W. M., and Julius, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416, 52–58. doi: 10.1038/nature719
- McNamara, C. R., Mandel-Brehm, J., Bautista, D. M., Siemens, J., Deranian, K. L., Zhao, M., et al. (2007). TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 13525–13530. doi: 10.1073/pnas.0705924104
- Meyer, R. A., and Campbell, J. N. (1981). Myelinated nociceptive afferents account for the hyperalgesia that follows a burn to the hand. *Science* 213, 1527–1529. doi: 10.1126/science.7280675
- Morales-Lázaro, S. L., and Rosenbaum, T. (2019). “Cholesterol as a key molecule that regulates TRPV1 channel function,” in *Direct Mechanisms in Cholesterol Modulation of Protein Function Advances in Experimental Medicine and Biology*, eds A. Rosenhouse-Dantsker and A. N. Bukiya (Cham: Springer International Publishing), 105–117. doi: 10.1007/978-3-030-14265-0_6
- Moran, M. M., McAlexander, M. A., Biró, T., and Szallasi, A. (2011). Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 601–620. doi: 10.1038/nrd3456
- Morenilla-Palao, C., Pertusa, M., Meseguer, V., Cabedo, H., and Viana, F. (2009). Lipid raft segregation modulates TRPM8 channel activity. *J. Biol. Chem.* 284, 9215–9224. doi: 10.1074/jbc.M807228200
- Nilius, B., and Szallasi, A. (2014). Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. *Pharmacol. Rev.* 66, 676–814. doi: 10.1124/pr.113.008268
- Oberwinkler, J., and Philipp, S. E. (2014). “TRPM3,” in *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels Handbook of Experimental Pharmacology*, eds B. Nilius and V. Flockerzi (Berlin: Springer Berlin Heidelberg), 427–459. doi: 10.1007/978-3-642-54215-2_17
- Pan, H.-L., Khan, G. M., Alloway, K. D., and Chen, S.-R. (2003). Resiniferatoxin induces paradoxical changes in thermal and mechanical sensitivities in rats: mechanism of action. *J. Neurosci.* 23, 2911–2919. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-07-02911.2003
- Payrits, M., Ságghy, É, Cseko, K., Pohóczyk, K., Bölcseki, K., Ernszt, D., et al. (2017). Estradiol sensitizes the transient receptor potential Vanilloid 1 receptor in pain responses. *Endocrinology* 158, 3249–3258. doi: 10.1210/en.2017-00101
- Peier, A. M., Moqrich, A., Hergarden, A. C., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Story, G. M., et al. (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108, 705–715. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00652-9
- Picazo-Juárez, G., Romero-Suárez, S., Nieto-Posadas, A., Llorente, I., Jara-Oseguera, A., Briggs, M., et al. (2011). Identification of a binding motif in the S5 helix that confers cholesterol sensitivity to the TRPV1 ion channel. *J. Biol. Chem.* 286, 24966–24976. doi: 10.1074/jbc.M111.237537
- Reid, G., and Flonta, M.-L. (2002). Ion channels activated by cold and menthol in cultured rat dorsal root ganglion neurones. *Neurosci. Lett.* 324, 164–168. doi: 10.1016/S0304-3940(02)00181-7
- Romanovsky, A. A., Almeida, M. C., Garami, A., Steiner, A. A., Norman, M. H., Morrison, S. F., et al. (2009). The transient receptor potential Vanilloid-1 channel in thermoregulation: a thermosensor it is not. *Pharmacol. Rev.* 61, 228–261. doi: 10.1124/pr.109.001263
- Ságghy, É, Payrits, M., Biró-Sütö, T., Skoda-Földes, R., Szánti-Pintér, E., Erostyák, J., et al. (2018). Carboxamido steroids inhibit the opening properties of transient receptor potential ion channels by lipid raft modulation. *J. Lipid Res.* 59, 1851–1863. doi: 10.1194/jlr.M084723
- Ságghy, É, Szóke, É, Payrits, M., Helyes, Z., Börzsei, R., Erostyák, J., et al. (2015). Evidence for the role of lipid rafts and sphingomyelin in Ca²⁺-gating of transient receptor potential channels in trigeminal sensory neurons and peripheral nerve terminals. *Pharmacol. Res.* 100, 101–116. doi: 10.1016/j.phrs.2015.07.028
- Saha, S., Ghosh, A., Tiwari, N., Kumar, A., Kumar, A., and Goswami, C. (2017). Preferential selection of Arginine at the lipid-water-interface of TRPV1 during vertebrate evolution correlates with its snorkeling behaviour and cholesterol interaction. *Sci. Rep.* 7:16808. doi: 10.1038/s41598-017-16780-w
- Salas, M. M., Hargreaves, K. M., and Akopian, A. N. (2009). TRPA1-mediated responses in trigeminal sensory neurons: interaction between TRPA1 and TRPV1. *Eur. J. Neurosci.* 29, 1568–1578. doi: 10.1111/j.1460-9568.2009.06702.x
- Sántha, P., Dobos, I., Kis, G., and Jancsó, G. (2020). Role of gangliosides in peripheral pain mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* 21:1005. doi: 10.3390/ijms21031005
- Sauer, R.-S., Rittner, H. L., Roewer, N., Sohajda, T., Shityakov, S., Brack, A., et al. (2017). A novel approach for the control of inflammatory pain: prostaglandin E2 complexation by randomly methylated β -Cyclodextrins. *Anesth. Analg.* 124, 675–685. doi: 10.1213/ANE.0000000000001674
- Sharma, S. K., Vij, A. S., and Sharma, M. (2013). Mechanisms and clinical uses of capsaicin. *Eur. J. Pharmacol.* 720, 55–62. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.10.053
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569–572. doi: 10.1038/42408
- Straub, I., Krügel, U., Mohr, F., Teichert, J., Rizun, O., Konrad, M., et al. (2013). Flavanones that selectively inhibit TRPM3 attenuate thermal nociception in vivo. *Mol. Pharmacol.* 84, 736–750. doi: 10.1124/mol.113.086843
- Szánti-Pintér, E., Balogh, J., Csók, Z., Kollár, L., Gömöry, Á, and Skoda-Földes, R. (2011). Synthesis of steroid-ferrocene conjugates of steroidal 17-carboxamides via a palladium-catalyzed aminocarbonylation – Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction sequence. *Steroids* 76, 1377–1382. doi: 10.1016/j.steroids.2011.07.006
- Szánti-Pintér, E., Wouters, J., Gömöry, Á, Ságghy, É, Szóke, É, Helyes, Z., et al. (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. doi: 10.1016/j.steroids.2015.10.016
- Szóke, E., Seress, L., and Szolcsányi, J. (2002). Neonatal capsaicin treatment results in prolonged mitochondrial damage and delayed cell death of B cells in the rat trigeminal ganglia. *Neuroscience* 113, 925–937. doi: 10.1016/s0306-4522(02)00208-7
- Szóke, É, Börzsei, R., Tóth, D. M., Lengl, O., Helyes, Z., Sándor, Z., et al. (2010). Effect of lipid raft disruption on TRPV1 receptor activation of trigeminal sensory neurons and transfected cell line. *Eur. J. Pharmacol.* 628, 67–74. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.11.052
- Szolcsányi, J. (2004). Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptides* 38, 377–384. doi: 10.1016/j.npep.2004.07.005
- Szolcsányi, J., Jancsó-Gábor, A., and Joó, F. (1975). Functional and fine structural characteristics of the sensory neuron blocking effect of capsaicin. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 287, 157–169. doi: 10.1007/BF00510447
- Tjølsen, A., Berge, O. G., Hunskaar, S., Rosland, J. H., and Hole, K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51, 5–17. doi: 10.1016/0304-3959(92)90003-t
- Travisani, M., Siemens, J., Materazzi, S., Bautista, D. M., Nassini, R., Campi, B., et al. (2007). 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 13519–13524. doi: 10.1073/pnas.0705923104
- Vilceanu, D., and Stucky, C. L. (2010). TRPA1 mediates mechanical currents in the plasma membrane of mouse sensory neurons. *PLoS One* 5:e12177. doi: 10.1371/journal.pone.0012177
- Vriens, J., Held, K., Janssens, A., Tóth, B. I., Kerselaers, S., Nilius, B., et al. (2014). Opening of an alternative ion permeation pathway in a nociceptor TRP channel. *Nat. Chem. Biol.* 10, 188–195. doi: 10.1038/nchembio.1428

- Vriens, J., Owsianik, G., Hofmann, T., Philipp, S. E., Stab, J., Chen, X., et al. (2011). TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. *Neuron* 70, 482–494. doi: 10.1016/j.neuron.2011.02.051
- Wagner, T. F. J., Loch, S., Lambert, S., Straub, I., Mannebach, S., Mathar, I., et al. (2008). Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic β cells. *Nat. Cell Biol.* 10, 1421–1430. doi: 10.1038/ncb1801
- Watanabe, S., Tan-No, K., Tadano, T., and Higashi, H. (2011). Intraplantar injection of gangliosides produces nociceptive behavior and hyperalgesia via a glutamate signaling mechanism. *Pain* 152, 327–334. doi: 10.1016/j.pain.2010.10.036

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Horváth, Biró-Sütő, Kántás, Payrits, Skoda-Földes, Szánti-Pintér, Helyes and Szőke. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Analgesic Effects of Lipid Raft Disruption by Sphingomyelinase and Myriocin via Transient Receptor Potential Vanilloid 1 and Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Ion Channel Modulation

Ádám Horváth^{1,2*}, Maja Payrits^{1,2}, Anita Steib^{1,2}, Boglárka Kántás^{1,2}, Tünde Biró-Sütő^{1,2}, János Erostyák^{2,3}, Géza Makkai^{2,3}, Éva Sághy^{1,2,4}, Zsuzsanna Helyes^{1,2} and Éva Szőke^{1,2}

¹Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Pécs, Medical School, Pécs, Hungary, ²János Szentágotthai Research Centre and Centre for Neuroscience, University of Pécs, Pécs, Hungary, ³Department of Experimental Physics, Faculty of Sciences, University of Pécs, Pécs, Hungary, ⁴Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Semmelweis University, Budapest, Hungary

OPEN ACCESS

Edited by:

Maria Tiziana Corasaniti,
University of Catanzaro, Italy

Reviewed by:

Danilo De Gregorio,
McGill University, Canada
Livio Luongo,
University of Campania Luigi Vanvitelli,
Italy

*Correspondence:

Ádám Horváth
horvatadam7@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Neuropharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 10 August 2020

Accepted: 24 November 2020

Published: 27 January 2021

Citation:

Horváth Á, Payrits M, Steib A, Kántás B, Biró-Sütő T, Erostyák J, Makkai G, Sághy É, Helyes Z and Szőke É (2021) Analgesic Effects of Lipid Raft Disruption by Sphingomyelinase and Myriocin via Transient Receptor Potential Vanilloid 1 and Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Ion Channel Modulation. *Front. Pharmacol.* 11:593319. doi: 10.3389/fphar.2020.593319

Transient Receptor Potential (TRP) Vanilloid 1 and Ankyrin 1 (TRPV1, TRPA1) cation channels are expressed in nociceptive primary sensory neurons, and integratively regulate nociceptor and inflammatory functions. Lipid rafts are liquid-ordered plasma membrane microdomains rich in cholesterol, sphingomyelin and gangliosides. We earlier showed that lipid raft disruption inhibits TRPV1 and TRPA1 functions in primary sensory neuronal cultures. Here we investigated the effects of sphingomyelinase (SMase) cleaving membrane sphingomyelin and myriocin (Myr) prohibiting sphingolipid synthesis in mouse pain models of different mechanisms. SMase (50 mU) or Myr (1 mM) pretreatment significantly decreased TRPV1 activation (capsaicin)-induced nocifensive eye-wiping movements by 37 and 41%, respectively. Intraplantar pretreatment by both compounds significantly diminished TRPV1 stimulation (resiniferatoxin)-evoked thermal allodynia developing mainly by peripheral sensitization. SMase (50 mU) also decreased mechanical hyperalgesia related to both peripheral and central sensitizations. SMase (50 mU) significantly reduced TRPA1 activation (formalin)-induced acute nocifensive behaviors by 64% in the second, neurogenic inflammatory phase. Myr, but not SMase altered the plasma membrane polarity related to the cholesterol composition as shown by fluorescence spectroscopy. These are the first *in vivo* results showing that sphingolipids play a key role in lipid raft integrity around nociceptive TRP channels, their activation and pain sensation. It is concluded that local SMase administration might open novel perspective for analgesic therapy.

Abbreviations: CAPS, capsaicin; CGRP, calcitonin gene-related peptide; CHO, Chinese hamster ovary; ECS, extracellular solution; Laurdan, 6-dodecanoyl-N,N-dimethyl-naphthylamine; MCD, methyl β -cyclodextrin; Myr, myriocin; PGE2, prostaglandin E2; RAMEB, random methylated β -cyclodextrins; RM, repeated measurement; RTX, resiniferatoxin; TRP, Transient Receptor Potential; TRPA1, Transient Receptor Potential Ankyrin 1; TRPC1, Transient Receptor Potential Canonical 1; TRPC3, Transient Receptor Potential Canonical 3; TRPV1, Transient Receptor Potential Vanilloid 1.

Keywords: lipid raft, myriocin, pain, sensory neuron, sphingomyelinase, transient receptor potential

INTRODUCTION

Cell physiology is influenced by lipid rafts, which are specialized cholesterol-, sphingomyelin- and ganglioside-rich plasma membrane microdomains, surrounding several receptors and ion channels (Simons and Ikonen, 1997). Membrane disintegration causes pathophysiological processes, such as neurodegeneration, neuropathy (Lee et al., 2014; Sonnino et al., 2014; Gambert et al., 2017) and synaptic transmission disruption (De Chiara et al., 2013). Modifying plasma membrane functions is a mechanism of action for pharmacological therapeutic interventions and/or side effects like the cytotoxic actions of anticancer drugs (Adinolfi et al., 2013), endocannabinoid-mediated analgesia (Rossi et al., 2012) and hyperalgesia (Dina et al., 2005). Our previous studies provided evidence that lipid raft disruption decreased the activation of Transient Receptor Potential (TRP) ion channels. These receptors are nonselective cation channels that open in response to temperature changes, binding of a broad range of exogenous and endogenous ligands, as well as other alterations of the channel protein (Gees et al., 2012; Vay et al., 2012). TRP “channelopathies” induce several diseases, such as skeletal muscle disorders, multiple kidney diseases and inherited pain syndrome (Moran et al., 2011; Nilius and Szallasi, 2014). Although pharmaceutical companies have put great efforts and investments into the development of TRP antagonists, only few drug candidates have reached the clinical stages of drug development (Szolcsányi and Sándor, 2012; Kaneko and Szallasi, 2014; Nilius and Szallasi, 2014).

TRP Vanilloid 1 (TRPV1) - expressed in the large population of polymodal nociceptors - is a nociceptor plasma protein gated by noxious heat (>43°C), protons (pH < 6.0), vanilloid-type agonists such as capsaicin (CAPS) and its synthetic analogs, resiniferatoxin (RTX), endogenous arachidonic acid or other fatty acid metabolites (Hwang et al., 2000; Smart et al., 2000; Welch et al., 2000; Raisinghani et al., 2005; Bianchi et al., 2006; Caterina and Park, 2006; Gavva, 2008; Myers et al., 2008; Szolcsányi, 2008; Cao et al., 2013; Aiello et al., 2016). Another similar TRP channel, TRP Ankyrin 1 (TRPA1), is often colocalized with TRPV1 on the CAPS-sensitive sensory nerves (Salas et al., 2009). Exogenous irritants, such as allyl-isothiocyanate (in mustard oil), cinnamaldehyde, allicin, 4-hydroxynonenal and mediators produced by inflammation or tissue injury, e.g., formaldehyde and methylglyoxal, as well as cold (below 17°C) and mechanical stimuli activate the TRPA1 receptor (Story et al., 2003; Bandell et al., 2004; Corey et al., 2004; Jordt et al., 2004; Macpherson et al., 2005; Macpherson et al., 2007; McNamara et al., 2007; Trevisani et al., 2007; Vilceanu and Stucky, 2010; Bautista et al., 2013; De Logu et al., 2019). Recent studies showed that both channels have some interactions with the endocannabinoid system and play an integrative role in regulating nociceptor and inflammatory functions (Akopian et al., 2008; Salas et al., 2009; Brizzi et al., 2014; Marrone et al., 2017). Pro-inflammatory

neuropeptides, such as Substance P and calcitonin gene-related peptide (CGRP) released from the CAPS-sensitive fibres induce vasodilation, plasma protein extravasation and inflammatory cell activation (neurogenic inflammation) in the innervated area (Helyes et al., 2003; Helyes et al., 2009; Szolcsányi, 2004).

TRP channels are surrounded by lipid rafts of the plasma membrane modifying their functions (Liu et al., 2006; Morenilla-Palao et al., 2009; Szöke et al., 2010; Sághy et al., 2015). However, data are controversial about the outcomes of lipid raft disruption on TRP channel functions. Impaired TRP Canonical 1 (TRPC1) and TRP Canonical 3 (TRPC3) signaling was reported after methyl β -cyclodextrin (MCD) incubation depleting membrane cholesterol (Lockwich et al., 2000; Bergdahl et al., 2003; Graziani et al., 2006). In dorsal root ganglion neurons MCD treatment significantly reduced the CAPS-activated currents (Liu et al., 2006), but it had no effect on heat-evoked responses on TRPV1-transfected *Xenopus laevis* oocytes (Liu et al., 2003). MCD did not influence ^3H RTX binding to TRPV1 receptors on rat C6 glioma cells (Bari et al., 2005). Sphingomyelinase (SMase) hydrolyzes sphingomyelin (SM) to phosphocholine and ceramide (Kiyokawa et al., 2005; Kobayashi et al., 2006), thus influences the signaling through the cell membrane (Chao et al., 2011). The third mechanism to disrupt the lipid rafts besides MCD and SMase is to block the sphingolipid synthesis by inhibiting of serine palmitoyltransferase by myriocin (Myr) (Miyake et al., 1995).

Our previous results suggested that disrupting lipid rafts by pharmacologically depleting their various constituents, such as SM, cholesterol or gangliosides inhibited the CAPS-, and RTX-induced opening properties of TRPV1 and TRPA1 both on native sensory neurons and receptor-expressing cell lines (Szöke et al., 2010; Sághy et al., 2015). Fluorescence spectroscopy and filipin staining clearly supported the ability of MCD to deplete cholesterol from the cell membrane (Sághy et al., 2015). Besides the sensory neuronal cell bodies we also showed the ability of SMase to diminish TRPV1 and TRPA1 activation on the nerve terminals by measuring the release of the neuropeptide CGRP (Sághy et al., 2015).

Despite all these *in vitro* data showing that lipid raft disruption inhibits TRP channel activation, there are only few very recent reports investigating this phenomenon *in vivo*. Hyperalgesia responses in the RTX-evoked mouse neuropathy model (Lin et al., 2019) and prostaglandin E2 (PGE2) (Ferrari and Levine, 2015) administration were significantly attenuated by MCD. We recently reported the antihyperalgesic actions of MCD and a novel carboxamido-steroid compound in TRPV1 and TRPA1 activation-related mouse pain models (Horváth et al., 2020). Furthermore Myr exerted antitumor activity in a mouse melanoma model (Lee et al., 2011; Lee et al., 2012).

The aim of the present study is to examine the effects of SMase and Myr in mouse pain models of different mechanisms related to TRPV1 and TRPA1 activation.

MATERIALS AND METHODS

Ethics and Animals

Twelve- to Sixteen-week-old male NMRI mice were used in the formalin and RTX tests and male C57BL/6 mice of the same age in the CAPS-evoked wiping test. The animals were kept in the Laboratory Animal House of the Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Pécs. All experimental procedures were carried out according to the 1998/XXVIII Act of the Hungarian Parliament on Animal Protection and Consideration Decree of Scientific Procedures of Animal Experiments (243/1988). The studies were approved by the Ethics Committee on Animal Research of Pécs University according to the Ethical Codex of Animal Experiments and license was given (license no. BAI/35/702-6/2018).

Capsaicin-Evoked Acute Chemonociceptive Reaction

To characterize the effect of SMase and Myr - compared to the saline or dimethyl sulfoxide (DMSO) controls - on acute chemonociception, 30 µg/ml CAPS (20 µl, TRPV1 agonist) was instilled in the right eye of mice. Local pretreatments (20 µl) with 50 mU SMase or 1 mM Myr were performed 30 min or 24 h before the examination, respectively. CAPS-induced eye-wiping movements with the forelegs were counted in a 1-min period, as previously described (Szolcsányi et al., 1975; Szöke et al., 2002; Horváth et al., 2020). Only the one-leg movements were counted, washing-, or two-hand movements were not considered. CAPS administration was repeated in the second and third hours of the test.

Resiniferatoxin-Induced Thermal Allodynia and Mechanical Hyperalgesia

The effects of SMase and Myr were compared to the saline or DMSO controls in the RTX-induced (ultrapotent TRPV1 agonist) thermal allodynia and mechanonociceptive hyperalgesia model. RTX (0.1 µg/ml, 20 µl) was injected into right hindpaw of the animals, which evokes acute neurogenic inflammatory response with thermal allodynia and mechanical hyperalgesia (Meyer and Campbell, 1981; Pan et al., 2003). Baseline thermal- and mechanical threshold values were determined on two consecutive days, and these data were used for self-control comparisons. Intraplantar pretreatments (20 µl) with 50 mU SMase or 1 mM Myr were performed 30 min or 24 h before the RTX injection, respectively. RTX injection evoked an acute nocifensive reaction of paw licking, biting, lifting or shaking, but these behavioral changes lasted for less than a couple of minutes. The thermonociceptive threshold was measured by an increasing temperature Hot Plate (IITC Life Science, Woodland Hills, CA, United States) in the 10th, 20th and 30th min (Almási et al., 2003; Kántás et al., 2019; Horváth et al., 2020), and the mechanonociceptive threshold by a Dynamic Plantar Aesthesiometer (DPA, Ugo Basile, Italy)

in the 30th, 60th and 90th min, as described earlier (Payrits et al., 2017; Kántás et al., 2019; Horváth et al., 2020).

Formalin-Evoked Acute Nocifensive Behavior

The effect of SMase and Myr compared to the saline- or DMSO-pretreated controls, were investigated on formalin-evoked (20 µl, 2.5%; into the right hindpaw) nocifensive behaviors. Intraplantar pretreatments (20 µl) with 50 mU SMase or 1 mM Myr were performed 30 min and 24 h before the examination, respectively. The duration of the nocifensive behaviors (hind paw licking, biting, shaking and holding) was monitored in two phase (0–5 min and 20–45 min) (Bölcskei et al., 2005; Horváth et al., 2020). The first phase is related to the direct chemical stimulation of nociceptors, e.g., TRPA1. There is a period of 10–15 min, when the animals show lack of nocifensive reactions. The second phase starts 15–20 min after the formalin injection, and it is referring to neurogenic inflammatory mechanisms. For more details see work of Tjølsen and co-workers (Tjølsen et al., 1992).

Fluorescence Spectroscopy to Determine Membrane Polarity Related to Lipid Raft Integrity

Native Chinese Hamster Ovary (CHO) cells were incubated with 6-dodecanoyl-N,N-dimethyl-2-naphthylamine (Laurdan) in 40 µM final concentration for 40 min at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. The spectral shape and position of fluorescence emission and excitation spectra of Laurdan depend both on the speed of its dipolar relaxation and the polarity of its microenvironment in the membrane (Harris et al., 2002; Gaus et al., 2003). Cells were treated with 30 mU SMase or 100 nM Myr - dissolved in extracellular solution (ECS) - for 45 min at 37°C before Laurdan administration, then washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) and scraped from the plates into 1 ml PBS.

Fluorescence excitation and emission spectra, excitation-emission matrices and anisotropy spectra, were measured by a HORIBA Jobin-Yvon Nanolog FL3-2iHR spectrofluorometer equipped with a 450-W xenon lamp. Samples were measured in a 4 mm path length quartz cuvette (Hellma 104F-QS) and kept at a constant 20°C using a Thermo Scientific circulating bath AC200-A25. Excitation-emission matrices consisting of a series of emission spectra recorded at different excitation wavelengths were measured to determine spectral changes. An excitation-emission matrix has one axis for the emission wavelengths, while the other includes the excitation wavelengths. At the intersection points, fluorescence intensity can be read as the value of the third axis. Steady-state emission anisotropy was measured in “L-format” arrangements to study the molecular mobility. Excitation was vertically polarized, while anisotropy was calculated from consecutively measured vertical and horizontally polarized emission intensities. Anisotropy $\langle r \rangle$ is defined as:

$$\langle r \rangle = \frac{I_{VV} - G^* I_{VH}}{I_{VV} + 2^* G^* I_{VH}},$$

where G is the spectrofluorometer's sensitivity factor given by:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}},$$

where I_{HV} and I_{HH} are measured using horizontally polarized excitation and vertically and horizontally polarized emission, respectively. G value was automatically recalculated at each points of the anisotropy measurements.

Drugs and Chemicals

Myr from *Mycelia sterilia* (PubChem CID: 643894) (Sigma, St. Louis, MO, United States) was dissolved in DMSO (PubChem CID: 679) to obtain 5 mM stock solution. Further dilutions were made with ECS or DMSO to reach the final concentrations of 100 nM or 1 mM, respectively. SMase from *Bacillus cereus* (PubChem CID: 6476900) was purchased from Sigma in a glycerol buffered solution, and further dilutions were made with ECS or saline to reach the concentrations of 30 or 50 mU. CAPS (PubChem CID: 1548943) was purchased from Sigma and diluted with saline from a 10 mg/ml stock solution of 10% ethanol (PubChem CID: 702), 10% Tween 80 (PubChem CID: 5284448) in saline. RTX (PubChem CID: 5702546) was purchased from Sigma and was dissolved in ethanol to yield a 1 mg/ml stock solution. Further dilutions were made with saline to reach final concentrations of 30 and 0.1 μ g/ml, respectively. Laurdan (PubChem CID: 104983) (Sigma) was dissolved in DMSO to obtain 10 mM stock solution, and further dilution was made with ECS to reach final concentration of 40 μ M. Formalin (PubChem CID: 712) - dilution was made with PBS (PubChem CID: 24978514) to reach final concentration of 2.5% - was prepared from a 6% buffered formaldehyde stock solution (Molar Inc. Hungary).

Statistical Analysis

Fluorescence spectroscopy measurements were performed with four samples per group. All of the animal experiment data are presented as means \pm SEM of six animals per group. Statistical analysis was performed by repeated measurement (RM) two-way ANOVA - the investigated factors were the pretreatment, time and their interaction (pretreatment \times time) - with Bonferroni multiple comparisons post hoc test, in all cases $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Spingomyelinase and Myriocin Reduce the Number of Capsaicin-Evoked Eye-Wipings

The number CAPS-evoked eye-wiping movements within a 1-min period was 42.0 ± 1.8 , 33.6 ± 1.7 and 28.0 ± 3.2 1, 2 and 3 h after local saline-pretreatment, respectively, in the control group showing desensitization in response to repeated

CAPS administration. SMase pretreatment significantly decreased the number of wiping in the first hour, the corresponding values were 26.6 ± 2.5 , 27.6 ± 2.2 and 24.6 ± 2.1 (Figure 1A).

Since Myr was dissolved in DMSO, this vehicle control was used in this experimental series. We also tested the DMSO in saline-pretreated animals compared to the DMSO-pretreated ones and we did not find significant difference (data not shown). In DMSO-pretreated animals CAPS administration induced 27.5 ± 2.8 ; 27.8 ± 1.4 ; 27.8 ± 2.4 eye wiping movements in the first, second and third hour, respectively. Myr pretreatment significantly diminished the number of eye-wipings in the first and second hour, these values were 16.2 ± 1.1 ; 19.0 ± 1.5 ; 23.5 ± 2.3 , respectively (Figure 1B).

Spingomyelinase and Myriocin Decrease the Resiniferatoxin-Induced Thermal Allodynia, and Spingomyelinase Abolish Mechanical Hyperalgesia

The baseline heat threshold values of untreated mice were between 44 and 49°C. RTX induced $27.0 \pm 2.8\%$; $20.9 \pm 3.0\%$ and $7.1 \pm 3.8\%$ drop of the thermnociceptive thresholds 10th, 20th and the 30th min after its intraplantar injection in the saline-pretreated control group. SMase pretreatment abolished the thermal allodynia in all measurement points with a decrease by $6.2 \pm 1.8\%$; $0.8 \pm 1.8\%$ and an increase by $1.2 \pm 0.4\%$, respectively (Figure 2A). The basal mechanonociceptive thresholds of intact mice were in a range of 9 and 10 g. RTX-evoked drop of the mechanonociceptive threshold values were $58.1 \pm 3.9\%$, $55.6 \pm 4.2\%$, $42.6 \pm 2.5\%$ 30, 60, and 90 min after the injection in the saline-pretreated control. SMase significantly alleviated the mechanical hyperalgesia in the 30th min, the respective values were $30.7 \pm 2.5\%$, $39.4 \pm 3.3\%$, $34.5 \pm 8.2\%$ (Figure 2B).

In case of Myr, the thermo- and mechanonociceptive threshold values of intact mice were between 44 and 49°C, 8 and 10 g, respectively. DMSO, as solvent of Myr was tested in saline-pretreated animals in contrast with DMSO-pretreated animals and significant desensitization effect was not revealed (data not shown). After RTX injection the thermnociceptive threshold in the DMSO-pretreated group decreased by $27.5 \pm 3.2\%$; $21.0 \pm 3.2\%$ and $4.9 \pm 3.8\%$ in the 10th, 20th and 30th min, respectively, while Myr-pretreated group values decreased by $10.7 \pm 5.2\%$; $6.3 \pm 3.0\%$ after 10 and 20 min its injection and increased by $5.5 \pm 1.4\%$ after 30 min. Myr pretreatment diminished the thermal allodynia in the 10th and 20th but not in the 30th min (Figure 3A). RTX-evoked mechanical hyperalgesia in the DMSO-pretreated control group were $43.9 \pm 4.8\%$; $34.7 \pm 4.3\%$; $28.6 \pm 4.7\%$ on the measurement points, compared to the Myr-pretreated group, these values were similar: $45.2 \pm 8.7\%$; $25.4 \pm 3.2\%$; $15.9 \pm 6.9\%$. Myr pretreatment did not alter the mechanical hyperalgesia at any time point (Figure 3B).

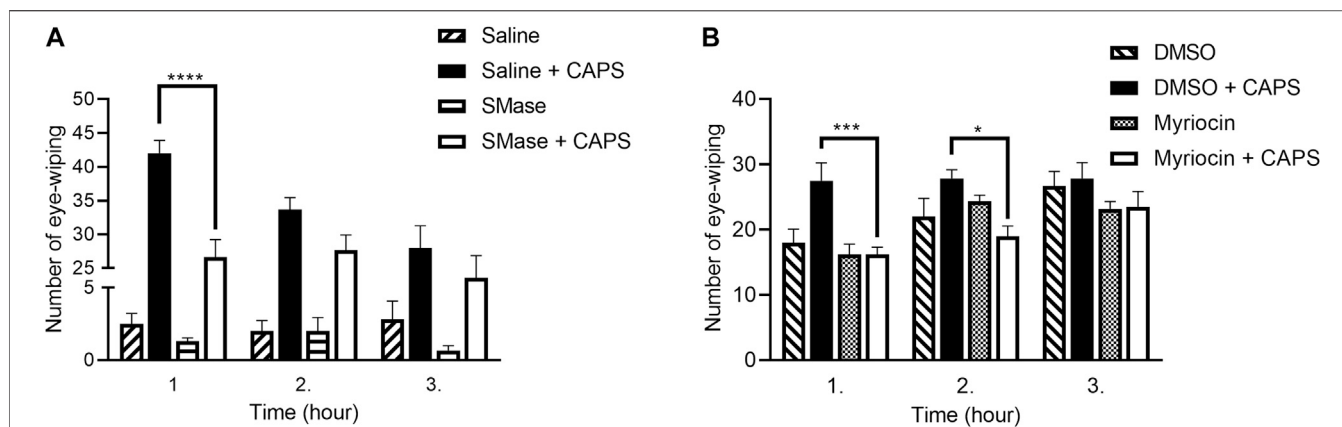


FIGURE 1 | Number of the eye-wiping movements in the CAPS-evoked acute chemociceptive reaction. 50 μ M SMase (A) and 1 mM Myr (B) also reduced the number of the eye-wiping movements. Data are means \pm SEM of $n = 6$ animals/group. The corresponding F values of the pretreatment, time and their interaction were $F_{(3,20)} = 292.3$; $F_{(2,40)} = 5.240$; $F_{(6,40)} = 3.731$ in case of SMase pretreatment and $F_{(3,20)} = 8.182$; $F_{(2,40)} = 9.976$; $F_{(6,40)} = 1.598$ in case of Myr pretreatment, respectively. RM-Two-way ANOVA with Bonferroni post hoc test was used for statistical analysis ($*p < 0.05$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$ SMase/Myr pretreatment vs. saline/DMSO pretreatment).

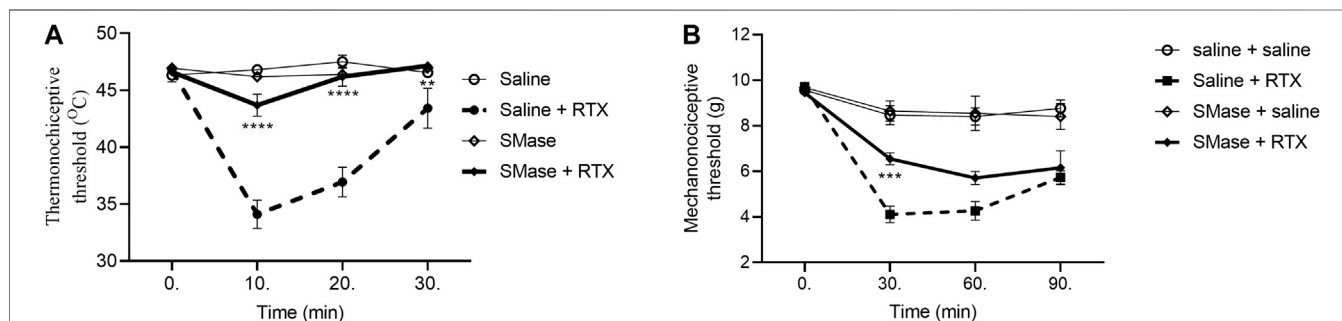


FIGURE 2 | Effect of 50 μ M SMase in the RTX-induced thermal allodynia (A) and mechanical hyperalgesia (B). Data are means \pm SEM of $n = 6$ animals/group. Dashed and solid curves represent the saline and SMase pretreatments after RTX injection, respectively. The corresponding F values of the pretreatment, time and their interaction were $F_{(3,20)} 94.61$; $F_{(3,60)} 19.76$; $F_{(9,60)} 12.17$ in the thermal allodynia and $F_{(3,20)} 22.88$; $F_{(3,60)} 64.75$; $F_{(9,60)} 9.859$ in the mechanical hyperalgesia respectively. RM-Two-way ANOVA with Bonferroni post hoc test was used for statistical analysis ($**p < 0.01$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$ SMase-pretreated group vs. saline-pretreated group).

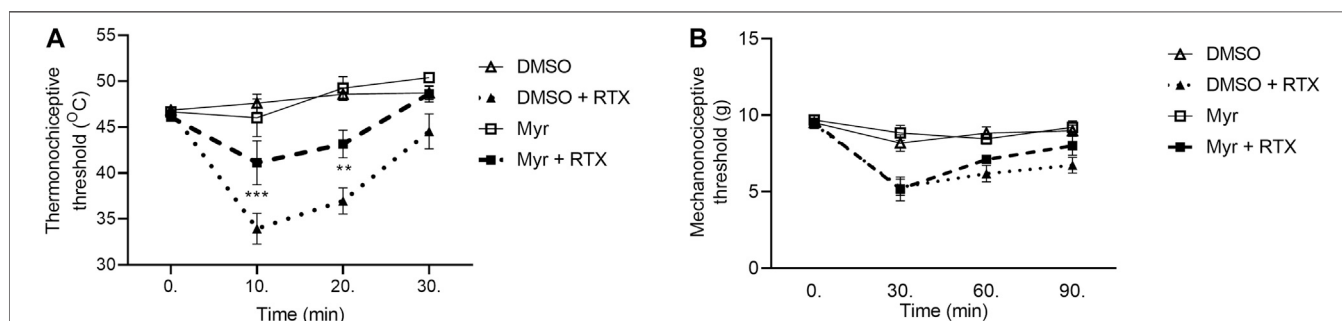
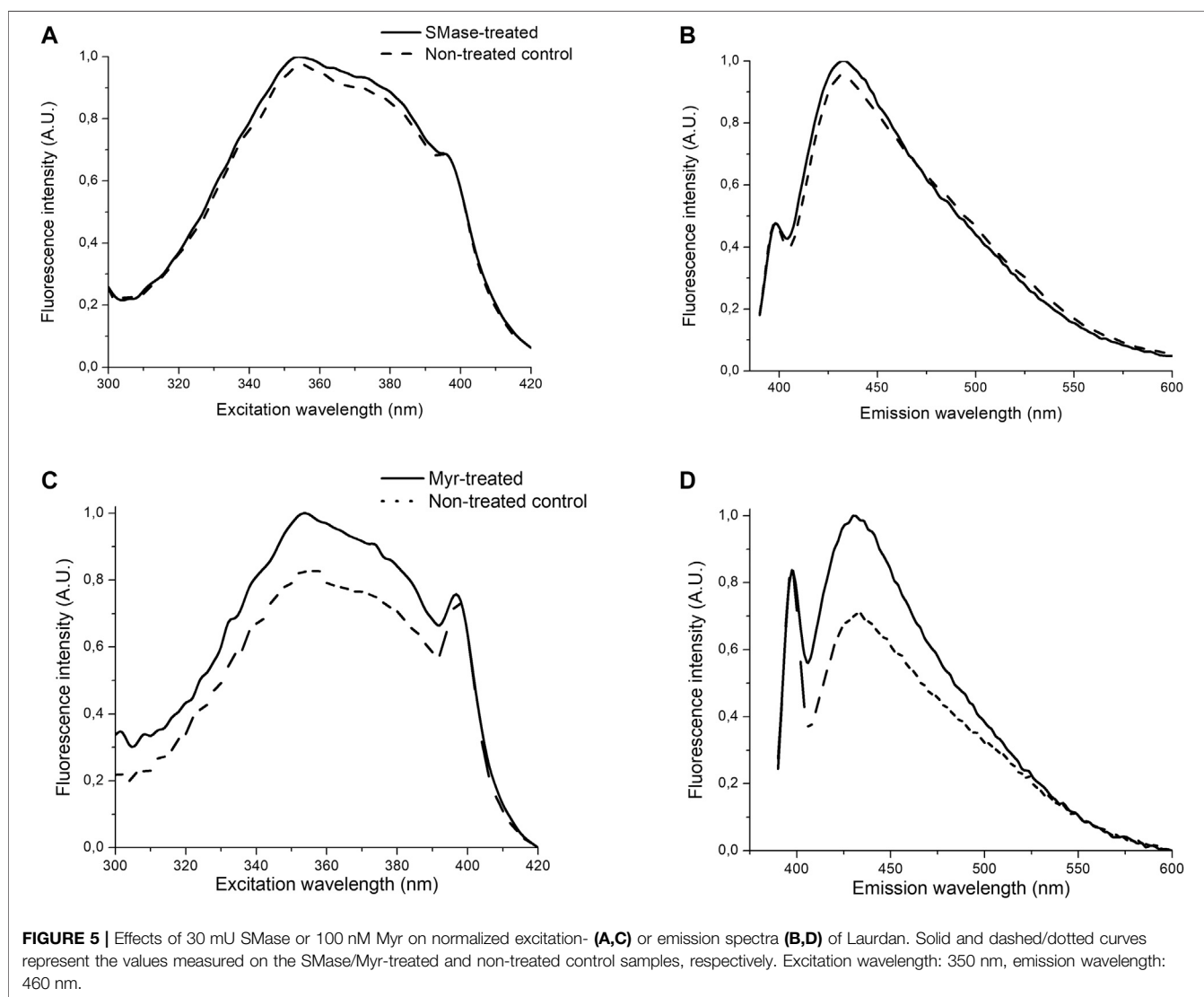
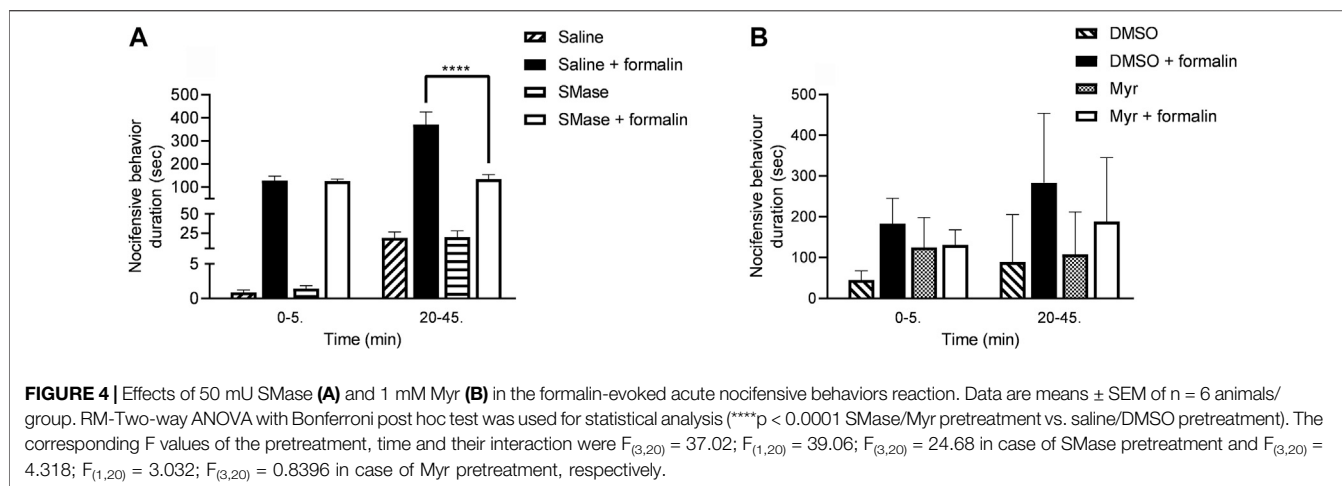
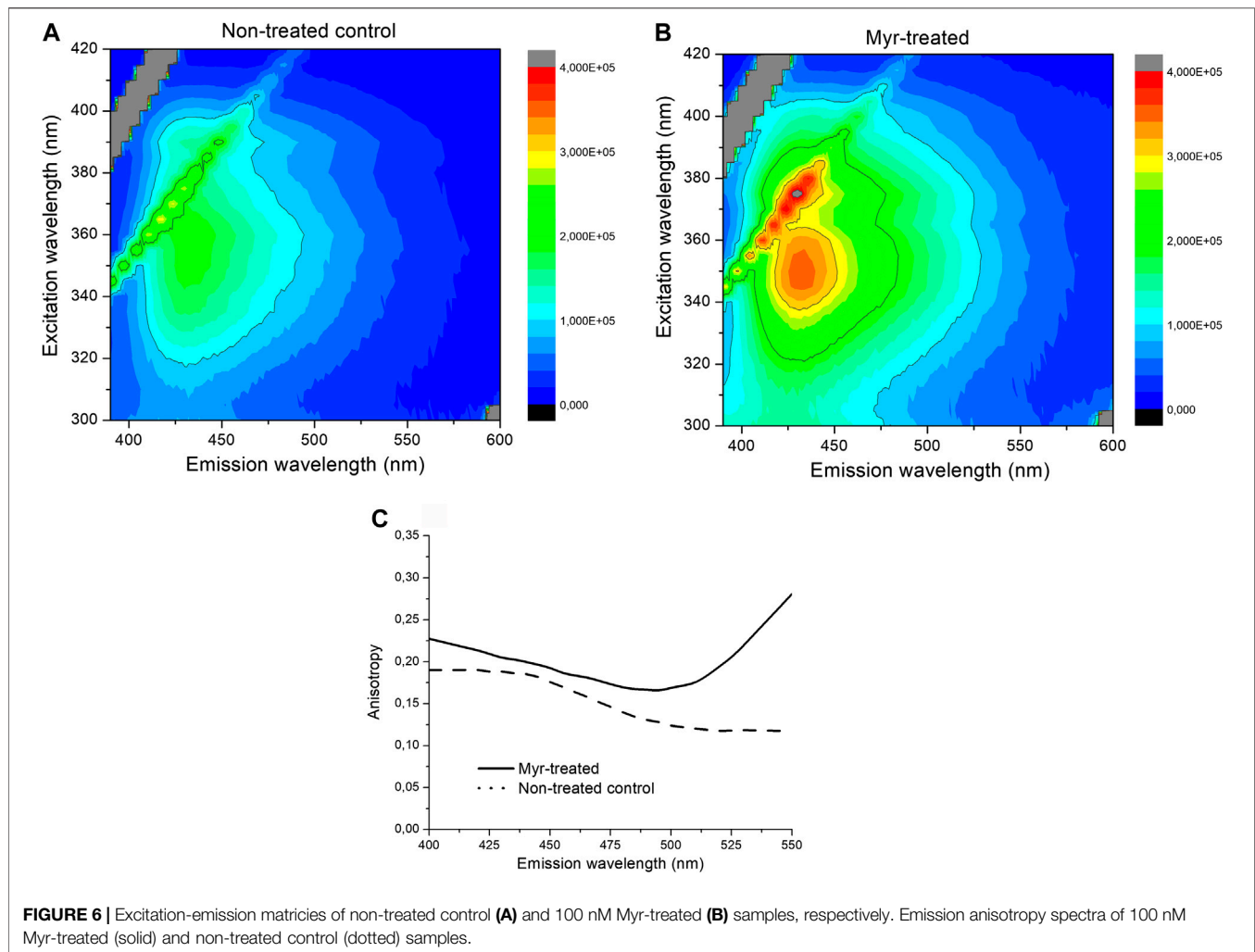


FIGURE 3 | Effect of 1 mM Myr in the RTX-induced thermal allodynia (A) and mechanical hyperalgesia (B). Data are means \pm SEM of $n = 6$ animals/group. Dotted and dashed curves represent the DMSO and Myr pretreatments after RTX injection, respectively. The corresponding F values of the pretreatment, time and their interaction were $F_{(3,20)} 20.80$; $F_{(3,60)} 19.62$; $F_{(9,60)} 6.617$ in the thermal allodynia and $F_{(3,20)} 11.95$; $F_{(3,60)} 35.96$; $F_{(9,60)} 4.736$ in the mechanical hyperalgesia respectively. RM-Two-way ANOVA with Bonferroni post hoc test was used for statistical analysis ($**p < 0.01$; $***p < 0.001$ Myr-pretreated group vs. DMSO-pretreated group).





Sphingomyelinase Diminish Formalin-Evoked Acute Nocifensive Behaviors

The durations of formalin-induced paw lickings, liftings and shakings in the saline-pretreated control group were 127.2 ± 18.5 s and 371.1 ± 54.4 s in the first and second phases, respectively. SMase-pretreatment did not influence the acute chemonocifensive behavior in first phase due to direct activation of TRPA1 receptors on the sensory nerve endings, but induced significant inhibition in the second phase related to the acute neurogenic inflammatory reaction. The corresponding results were the following in the first and second phases, respectively: 125.9 ± 8.0 and 134.1 ± 20.1 s (Figure 4A).

In case of Myr, DMSO as its solvent was tested in saline-pretreated animals in contrast to DMSO-pretreated animals, and significant differences in the two groups was not found (data now shown). The formalin-evoked nocifensive behavior durations in the first phase were 183.1 ± 25.3 and 131.0 ± 15.2 s in the DMSO-pretreated control group and Myr-pretreated group, respectively. The durations of the second phase were 283.4 ± 69.4 and 188.7 ± 63.8 s in the DMSO control and

Myr-pretreated animals. Myr had some biological effect, however this was not significant (Figure 4B).

Myriocin Changes the Membrane Polarity

SMase treatment did not influence the fluorescence spectroscopy picture as compared to the non-treated control. Spectral shift, broadening or changes in the shape of the spectra or intensity were not detected, as shown by no signal alterations of Laurdan. No changes were detected in the steady-state emission anisotropy measurements and transition from liquid-ordered to -disordered phase between the SMase-treated and non-treated cells (Figures 5A,B). In contrast to SMase, Myr treatment significantly modified the membrane microenvironment. The fluorescence emission was stronger in the Myr-treated samples than in the non-treated ones as shown by both excitation and emission spectra (Figures 5C,D). Excitation-emission matrices on the entire spectral region of Laurdan fluorescence also showed that the Myr-treated samples had higher fluorescence intensity than the non-treated control samples (Figures 6A,B). Emission anisotropy values of Myr-treated samples were significantly higher on the whole spectral range (Figure 6C).

DISCUSSION

We present here the first data on the analgesic effect of lipid raft disruption by SMase-induced SM hydrolyzation (Kiyokawa et al., 2005; Kobayashi et al., 2006) or Myr-induced glycosphingolipid synthesis blockade (Miyake et al., 1995). We proved that SMase and Myr decrease CAPS-evoked eye-wipings, as well as RTX-induced thermal allodynia, furthermore, SMase decreases the RTX-induced mechanical hyperalgesia and duration of the formalin-evoked -acute nocifensive behavior.

SMase and Myr significantly decreased TRPV1 activation-evoked eye-wiping movements by 37 and 41%, respectively. The decreasing response to repeated CAPS instillation was due to TRPV1 receptor desensitization (Sharma et al., 2013). Furthermore, SMase almost abolished TRPV1 stimulation-induced thermal allodynia and significantly reduced mechanical hyperalgesia. Myr had significant inhibitory effect on thermal allodynia induced predominantly by peripheral sensitization mechanisms, but not mechanical hyperalgesia involving central sensitization processes as well (Pan et al., 2003). TRPA1 activation-evoked acute neurogenic inflammatory nocifensive reactions were also significantly diminished by SMase (by 64%), while only non-significant decreasing tendency was induced by Myr.

These novel *in vivo* findings are well supported by our previous *in vitro* results demonstrating the ability of SMase and Myr to significantly and concentration-dependently inhibit TRPV1 receptor activation both on TRPV1 receptor-expressing cell line and primary cultures of trigeminal sensory neurons, similarly to MCD (Szöke et al., 2010). Furthermore, similar inhibitory actions of these lipid raft disruptors were described on the TRPA1, TRP Melastatin 8, but not the TRP Melastatin 3 cation channels (Sághy et al., 2015).

We provide the first direct evidence by fluorescence spectroscopy for the ability of Myr to induce transition from liquid-ordered to liquid-disordered phase indicating cholesterol depletion in the plasma membrane. Higher fluorescence intensity means less non-radiative processes of Laurdan and higher anisotropy reflects to more restricted motion of Laurdan after Myr treatment. These findings together indicate a more compact, closed membrane structure around Laurdan molecules. In contrast, SMase treatment did not influence the membrane polarity. We have previously proved that fluorescence spectroscopy is an appropriate technique to determine the plasma cholesterol content by comparing this method with the conventional filipin staining after MCD treatment in the same cell cultures (Sághy et al., 2015).

The formation of lipid rafts in the plasma membrane depends on the interaction of SM and cholesterol (Simons and Ikonen, 1997; Ridgway, 2000). Cholesterol content of the lipid membrane does not affect significantly the biosynthesis of SMs being involved in a variety of essential cellular functions (Ridgway, 2000). It has been reported that SM and cholesterol synthesis are independent processes in cultured human intestinal cells, but the amount of cholesterol and SM regulate their synthesis rates (Chen et al., 1993). It has been described that orally administered Myr

decreases not only SM, but also cholesterol levels of the small intestinal epithelial cell plasma membrane (Li et al., 2009).

Although results of *in vitro* experiments provided evidence, that lipid raft disruption inhibited the activation mechanisms of TRP channels (Szöke et al., 2010; Sághy et al., 2015), there are only few recent animal experiments to prove this phenomenon *in vivo*. Cholesterol depletion by MCD induced antinociception in RTX-induced neuropathy in the mouse through phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis (Lin et al., 2019). Furthermore, MCD and a novel carboxamido-steroid compound were able to exert antinociceptive effects by decreasing the activation of TRPV1 and TPRA1 ion channels in mice in distinct pain mechanisms (Horváth et al., 2020). The mechanical hyperalgesia induced by PGE₂, but not cyclopentyladenosine was attenuated by MCD injection into the rat paw, suggesting that PGE₂-evoked hyperalgesic effect is dependent on the lipid raft integrity (Ferrari and Levine, 2015). Complete Freund's adjuvant-induced thermal and mechanical hyperalgesia was attenuated by both local and systemic administration of random methylated β -cyclodextrins (RAMEB) in rats. The authors suggest that RAMEB capture the prostaglandin content and then decrease the inflammatory pain which might be a novel anti-inflammatory and analgesic tool (Sauer et al., 2017). In a very recent paper, the role of another components of lipid rafts, the gangliosides have been discussed in pain mechanisms (Sántha et al., 2020). Intraplantar injection of the ganglioside GT1b induced nociceptive responses and augmented formalin-evoked nocifensive reactions. Nevertheless, sialidase injection cleaving sialyl residues from gangliosides is able to diminish the nociceptive responses (Watanabe et al., 2011; Sántha et al., 2020).

The role of sphingolipids in pain sensation via the modulation of TRP channel activation is poorly understood and we had only *in vitro* experimental results (Szöke et al., 2010; Sághy et al., 2015). The present results are the first *in vivo* data providing clear evidence that sphingolipids play an important role in both TRPV1 and TRPA1-evoked nocifensive behaviors and hyperalgesia. Intraplantar pretreatments by both SMase and Myr inhibited thermal allodynia in the acute neurogenic inflammation model that develop mainly by peripheral sensitization of the sensory nerves. Furthermore, SMase injection into the paw even decreased mechanical hyperalgesia induced by both peripheral and central sensitization mechanisms (Pan et al., 2003), demonstrating a stronger inhibitory effect on the pseudo unipolar primary sensory neuron as compared to Myr. This observation together with the fact that SMase does not influence the membrane cholesterol composition support our conclusion on the key importance of sphingolipids over cholesterol in lipid raft integrity around TRPV1 and TRPA1 and consequent sensory nerve activation.

These *in vivo* results strongly suggest that membrane sphingolipid modification particularly by SMase might open novel analgesic opportunities. This innovative approach potently inhibits the activation of the sensory nerves via targeting pain sensing structures including TRPV1 and TRPA1. This might be particularly promising since it is more likely to inhibit the pathological activation, but not the

physiological functions of TRPV1 and TRPA1. Moreover, other main advantages are the opportunity for local administration and its rapid onset of action. Therefore, SMase seems to be a promising therapeutic tool with a good side effect profile (e.g. it could avoid the hyperthermic side effects of TRPV1 antagonists).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Ethics Committee on Animal Research of Pécs University.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization ÉSz and JS; methodology ÁH, BK, TB-S, MP, ÉSá, GM, JE, AS; formal analysis ÁH; investigation ÁH, BK, TB-S, MP, ÉSá, GM, JE, AS; resources ZH, ÉSz; writing—original draft preparation, ÁH; writing—review and editing ÉSz, ZH; visualization ÁH; supervision ÉSz, ZH; project administration ÁH, TB-S; funding acquisition ZH, ÉSz.

REFERENCES

- Adinolfi, B., Romanini, A., Vanni, A., Martinotti, E., Chicca, A., Fogli, S., et al. (2013). Anticancer activity of anandamide in human cutaneous melanoma cells. *Eur. J. Pharmacol.* 718, 154–159. doi:10.1016/j.ejphar.2013.08.039
- Aiello, F., Badolato, M., Pessina, F., Sticozzi, C., Maestrini, V., Aldinucci, C., et al. (2016). Design and synthesis of new transient receptor potential vanilloid type-1 (TRPV1) channel modulators: identification, molecular modeling analysis, and pharmacological characterization of the N-(4-Hydroxy-3-methoxybenzyl)-4-(thiophen-2-yl) butanamide, a small molecule endowed with agonist TRPV1 activity and protective effects against oxidative stress. *ACS Chem. Neurosci.* 7, 737–748. doi:10.1021/acscchemneuro.5b00333
- Akopian, A. N., Ruparel, N. B., Patwardhan, A., and Hargreaves, K. M. (2008). Cannabinoids desensitize capsaicin and mustard oil responses in sensory neurons via TRPA1 activation. *J. Neurosci.* 28, 1064–1075. doi:10.1523/JNEUROSCI.1565-06.2008
- Almási, R., Pethő, G., Bölcskei, K., and Szolcsányi, J. (2003). Effect of resiniferatoxin on the noxious heat threshold temperature in the rat: a novel heat allodynia model sensitive to analgesics. *Br. J. Pharmacol.* 139, 49–58. doi:10.1038/sj.bjp.0705234
- Bandell, M., Story, G. M., Hwang, S. W., Viswanath, V., Eid, S. R., Petrus, M. J., et al. (2004). Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron*. 41, 849–857. doi:10.1016/S0896-6273(04)00150-3
- Bari, M., Battista, N., Fezza, F., Finazzi-Agrò, A., and Maccarrone, M. (2005). Lipid rafts control signaling of type-1 cannabinoid receptors in neuronal cells. Implications for anandamide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 280, 12212–12220. doi:10.1074/jbc.M411642200
- Bautista, D. M., Pellegrino, M., and Tsunozaki, M. (2013). TRPA1: a gatekeeper for inflammation. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 181–200. doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183811

FUNDING

This work was supported by the National Brain Research Program 2017-1.2.1-NKP -2017-00002 (NAP-2; Chronic Pain Research Group). We acknowledge the grant of the Hungarian Government (GINOP-2.3.2-15-2016-00050, EFOP-3.6.2-16-2017-00006 and EFOP-3.6.2-16-2017-00008). ÉSz and ÉSá were supported by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences. The University of Pécs is acknowledged for a support by the 17886-4/23018/FEKUTSTRAT excellence grant. MP was supported by the New National Excellence Program of the Ministry of Human Capacities ÚNKP-18-4. ÉSz and ÉSá were supported by the New National Excellence Program of the Ministry of Human Capacities ÚNKP-18-4 and New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology ÚNKP-19-4 grant. ÁH was supported by the Gedeon Richter's Talentum Foundation.

ACKNOWLEDGMENTS

The fluorescence spectroscopy measurements were performed at the fluorescence Spectroscopy Laboratory of Histology and Light Microscopy Core Facility of the Szentagothai Research Centre. The authors thank Mr. Péter Kolossa for his expert assistance in the fluorescence spectroscopy measurements, Dóra Ömböli for expert technical assistance in the animal experimental procedures and the Late Prof. János Szolcsányi for his expert advices during the experimental procedures. Prof. Szolcsányi passed away during the course of this study, and this paper is dedicated to his memory.

- Bergdahl, A., Gomez, M. F., Dreja, K., Xu, S.-Z., Adner, M., Beech, D. J., et al. (2003). Cholesterol depletion impairs vascular reactivity to endothelin-1 by reducing store-operated Ca²⁺ entry dependent on TRPC1. *Circ. Res.* 93, 839–847. doi:10.1161/01.RES.0000100367.45446.A3
- Bianchi, B. R., Lee, C.-H., Jarvis, M. F., El Kouhen, R., Moreland, R. B., Faltynek, C. R., et al. (2006). Modulation of human TRPV1 receptor activity by extracellular protons and host cell expression system. *Eur. J. Pharmacol.* 537, 20–30. doi:10.1016/j.ejphar.2006.03.003
- Bölcskei, K., Helyes, Z., Szabó, Á., Sándor, K., Elekes, K., Németh, J., et al. (2005). Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain*. 117, 368–376. doi:10.1016/j.pain.2005.06.024
- Brizzi, A., Aiello, F., Marini, P., Cascio, M. G., Corelli, F., Brizzi, V., et al. (2014). Structure-affinity relationships and pharmacological characterization of new alkyl-resorcinol cannabinoid receptor ligands: identification of a dual cannabinoid receptor/TRPA1 channel agonist. *Bioorg. Med. Chem.* 22, 4770–4783. doi:10.1016/j.bmc.2014.07.006
- Cao, E., Cordero-Morales, J. F., Liu, B., Qin, F., and Julius, D. (2013). TRPV1 channels are intrinsically heat sensitive and negatively regulated by phosphoinositide lipids. *Neuron*. 77, 667–679. doi:10.1016/j.neuron.2012.12.016
- Caterina, M. J., and Park, U. (2006). “TRPV1: a polymodal sensor in the nociceptor terminal,” in *Current topics in membranes*. (Amsterdam, Netherlands: Elsevier), 113–150. doi:10.1016/S1063-5823(06)57003-6
- Chao, L., Chen, F., Jensen, K. F., and Hatton, T. A. (2011). Two-dimensional solvent-mediated phase transformation in lipid membranes induced by sphingomyelinase. *Langmuir*. 27, 10050–10060. doi:10.1021/la2015836
- Chen, H., Born, E., Mathur, S. N., and Field, F. J. (1993). Cholesterol and sphingomyelin syntheses are regulated independently in cultured human intestinal cells, CaCo-2: role of membrane cholesterol and sphingomyelin content. *J. Lipid Res.* 34, 2159–2167.

- Corey, D. P., García-Añoveros, J., Holt, J. R., Kwan, K. Y., Lin, S.-Y., Vollrath, M. A., et al. (2004). TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature*. 432, 723–730. doi:10.1038/nature03066
- De Chiara, V., Motta, C., Rossi, S., Studer, V., Barbieri, F., Lauro, D., et al. (2013). Interleukin-1 β alters the sensitivity of cannabinoid CB1 receptors controlling glutamate transmission in the striatum. *Neuroscience*. 250, 232–239. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.06.069
- De Logu, F., Li Puma, S., Landini, L., Portelli, F., Innocenti, A., de Araujo, D. S. M., et al. (2019). Schwann cells expressing nociceptive channel TRPA1 orchestrate ethanol-evoked neuropathic pain in mice. *J. Clin. Invest.* 129, 5424–5441. doi:10.1172/JCI128022
- Dina, O. A., Hucho, T., Yeh, J., Malik-Hall, M., Reichling, D. B., and Levine, J. D. (2005). Primary afferent second messenger cascades interact with specific integrin subunits in producing inflammatory hyperalgesia. *Pain*. 115, 191–203. doi:10.1016/j.pain.2005.02.028
- Ferrari, L. F., and Levine, J. D. (2015). Plasma membrane mechanisms in a preclinical rat model of chronic pain. *J. Pain*. 16, 60–66. doi:10.1016/j.jpain.2014.10.007
- Gambert, S., Gabrielle, P.-H., Masson, E., Leger-Charnay, E., Ferrero, A., Vannier, A., et al. (2017). Cholesterol metabolism and glaucoma: modulation of Muller cell membrane organization by 24S-hydroxycholesterol. *Chem. Phys. Lipids*. 207, 179–191. doi:10.1016/j.chemphyslip.2017.05.007
- Gaus, K., Gratton, E., Kable, E. P. W., Jones, A. S., Gelissen, I., Kritharides, L., et al. (2003). Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 15554–15559. doi:10.1073/pnas.2534386100
- Gavva, N. R. (2008). Body-temperature maintenance as the predominant function of the vanilloid receptor TRPV1. *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 550–557. doi:10.1016/j.tips.2008.08.003
- Gees, M., Owsianik, G., and Voets, T. (2012). “TRP channels,” in *Comprehensive physiology*. Editor R. Terjung (Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.), 563–608. doi:10.1002/cphy.c110026
- Graziani, A., Rosker, C., Kohlwein, S. D., Zhu, M. X., Romanin, C., Sattler, W., et al. (2006). Cellular cholesterol controls TRPC3 function: evidence from a novel dominant-negative knockdown strategy. *Biochem. J.* 396, 147–155. doi:10.1042/BJ20051246
- Harris, F. M., Best, K. B., and Bell, J. D. (2002). Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochim. Biophys. Acta*. 1565, 123–128. doi:10.1016/S0005-2736(02)00514-X
- Helyes, Z., Németh, J., Thán, M., Bölcskei, K., Pintér, E., and Szolcsányi, J. (2003). Inhibitory effect of anandamide on resiniferatoxin-induced sensory neuropeptide release *in vivo* and neuropathic hyperalgesia in the rat. *Life Sci.* 73, 2345–2353. doi:10.1016/S0004-3205(03)00651-9
- Helyes, Z., Pinter, E., Sandor, K., Elekes, K., Banvolgyi, A., Keszthelyi, D., et al. (2009). Impaired defense mechanism against inflammation, hyperalgesia, and airway hyperreactivity in somatostatin 4 receptor gene-deleted mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 13088–13093. doi:10.1073/pnas.0900681106
- Horváth, Á., Biró-Sütő, T., Kántás, B., Payrits, M., Skoda-Földes, R., Szánti-Pintér, E., et al. (2020). Antinociceptive effects of lipid raft disruptors, a novel carboxamido-steroid and methyl β -cyclodextrin, in mice by inhibiting transient receptor potential vanilloid 1 and Ankyrin 1 channel activation. *Front. Physiol.* 11, 559109. doi:10.3389/fphys.2020.559109
- Hwang, S. W., Cho, H., Kwak, J., Lee, S.-Y., Kang, C.-J., Jung, J., et al. (2000). Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 6155–6160. doi:10.1073/pnas.97.11.6155
- Jordt, S.-E., Bautista, D. M., Chuang, H., McKemy, D. D., Zygmunt, P. M., Högestätt, E. D., et al. (2004). Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature*. 427, 260–265. doi:10.1038/nature02282
- Kaneko, Y., and Szallasi, A. (2014). Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective. *Br. J. Pharmacol.* 171, 2474–2507. doi:10.1111/bph.12414
- Kántás, B., Börzsei, R., Szőke, É., Bánhegyi, P., Horváth, Á., Hunyady, Á., et al. (2019). Novel drug-like somatostatin receptor 4 agonists are potential analgesics for neuropathic pain. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 6245. doi:10.3390/ijms20246245
- Kiyokawa, E., Baba, T., Otsuka, N., Makino, A., Ohno, S., and Kobayashi, T. (2005). Spatial and functional heterogeneity of sphingolipid-rich membrane domains. *J. Biol. Chem.* 280, 24072–24084. doi:10.1074/jbc.M502244200
- Kobayashi, T., Takahashi, M., Nagatsuka, Y., and Hirabayashi, Y. (2006). Lipid rafts: new tools and a new component. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 1526–1531. doi:10.1248/bpb.29.1526
- Lee, Y.-S., Choi, K.-M., Choi, M.-H., Ji, S.-Y., Lee, S., Sin, D.-M., et al. (2011). Serine palmitoyltransferase inhibitor myricin induces growth inhibition of B16F10 melanoma cells through G(2)/M phase arrest. *Cell Prolif.* 44, 320–329. doi:10.1111/j.1365-2184.2011.00761.x
- Lee, Y.-S., Choi, K.-M., Lee, S., Sin, D.-M., Yoo, K.-S., Lim, Y., et al. (2012). Myricin, a serine palmitoyltransferase inhibitor, suppresses tumor growth in a murine melanoma model by inhibiting de novo sphingolipid synthesis. *Cancer Biol. Ther.* 13, 92–100. doi:10.4161/cbt.13.2.18870
- Lee, S., Amici, S., Tavori, H., Zeng, W. M., Freeland, S., Fazio, S., et al. (2014). PMP22 is critical for actin-mediated cellular functions and for establishing lipid rafts. *J. Neurosci.* 34, 16140–16152. doi:10.1523/JNEUROSCI.1908-14.2014
- Li, Z., Park, T.-S., Li, Y., Pan, X., Iqbal, J., Lu, D., et al. (2009). Serine palmitoyltransferase (SPT) deficient mice absorb less cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta*. 1791, 297–306. doi:10.1016/j.bbali.2009.01.010
- Lin, C.-L., Chang, C.-H., Chang, Y.-S., Lu, S.-C., and Hsieh, Y.-L. (2019). Treatment with methyl- β -cyclodextrin prevents mechanical allodynia in resiniferatoxin neuropathy in a mouse model. *Biol. Open*. 8, bio039511. doi:10.1242/bio.039511
- Liu, B., Hui, K., and Qin, F. (2003). Thermodynamics of heat activation of single capsaicin ion channels VR1. *Biophys. J.* 85, 2988–3006. doi:10.1016/S0006-3495(03)74719-5
- Liu, M., Huang, W., Wu, D., and Priestley, J. V. (2006). TRPV1, but not P2X₂, requires cholesterol for its function and membrane expression in rat nociceptors. *Eur. J. Neurosci.* 24, 1–6. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04889.x
- Lockwich, T. P., Liu, X., Singh, B. B., Jadlowiec, J., Weiland, S., and Ambudkar, I. S. (2000). Assembly of Trp1 in a signaling complex associated with caveolin-scaffolding lipid raft domains. *J. Biol. Chem.* 275, 11934–11942. doi:10.1074/jbc.275.16.11934
- Macpherson, L. J., Geierstanger, B. H., Viswanath, V., Bandell, M., Eid, S. R., Hwang, S., et al. (2005). The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. *Curr. Biol.* 15, 929–934. doi:10.1016/j.cub.2005.04.018
- Macpherson, L. J., Dubin, A. E., Evans, M. J., Marr, F., Schultz, P. G., Cravatt, B. F., et al. (2007). Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature*. 445, 541–545. doi:10.1038/nature05544
- Marrone, M. C., Morabito, A., Giustizieri, M., Chiurchiù, V., Leuti, A., Mattioli, M., et al. (2017). TRPV1 channels are critical brain inflammation detectors and neuropathic pain biomarkers in mice. *Nat. Commun.* 8, 15292. doi:10.1038/ncomms15292
- McNamara, C. R., Mandel-Brehm, J., Bautista, D. M., Siemens, J., Deranian, K. L., Zhao, M., et al. (2007). TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 13525–13530. doi:10.1073/pnas.0705924104
- Meyer, R. A., and Campbell, J. N. (1981). Myelinated nociceptive afferents account for the hyperalgesia that follows a burn to the hand. *Science*. 213, 1527–1529. doi:10.1126/science.7280675
- Miyake, Y., Kozutsumi, Y., Nakamura, S., Fujita, T., and Kawasaki, T. (1995). Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/Myricin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211, 396–403. doi:10.1006/bbrc.1995.1827
- Moran, M. M., McAlexander, M. A., Biró, T., and Szallasi, A. (2011). Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 601–620. doi:10.1038/nrd3456
- Morenilla-Palao, C., Pertusa, M., Meseguer, V., Cabedo, H., and Viana, F. (2009). Lipid raft segregation modulates TRPM8 channel activity. *J. Biol. Chem.* 284, 9215–9224. doi:10.1074/jbc.M807228200
- Myers, B. R., Bohlen, C. J., and Julius, D. (2008). A yeast genetic screen reveals a critical role for the pore helix domain in TRP channel gating. *Neuron*. 58, 362–373. doi:10.1016/j.neuron.2008.04.012

- Nilius, B., and Szallasi, A. (2014). Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. *Pharmacol. Rev.* 66, 676–814. doi:10.1124/pr.113.008268
- Pan, H.-L., Khan, G. M., Alloway, K. D., and Chen, S.-R. (2003). Resiniferatoxin induces paradoxical changes in thermal and mechanical sensitivities in rats: mechanism of action. *J. Neurosci.* 23, 2911–2919. doi:10.1523/JNEUROSCI.23-07-02911.2003
- Payrits, M., Sággy, É., Cseko, K., Pohóczy, K., Bölskei, K., Ernsts, D., et al. (2017). Estradiol sensitizes the transient receptor potential vanilloid 1 receptor in pain responses. *Endocrinology.* 158, 3249–3258. doi:10.1210/en.2017-00101
- Raisinghani, M., Pabbidi, R. M., and Premkumar, L. S. (2005). Activation of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) by resiniferatoxin. *J. Physiol.* 567, 771–786. doi:10.1113/jphysiol.2005.087874
- Ridgway, N. D. (2000). Interactions between metabolism and intracellular distribution of cholesterol and sphingomyelin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1484, 129–141. doi:10.1016/S1388-1981(00)00006-8
- Rossi, S., Sacchetti, L., Napolitano, F., De Chiara, V., Motta, C., Studer, V., et al. (2012). Interleukin-1 β causes anxiety by interacting with the endocannabinoid system. *J. Neurosci.* 32, 13896–13905. doi:10.1523/JNEUROSCI.1515-12.2012
- Sággy, É., Szőke, É., Payrits, M., Helyes, Z., Börzsei, R., Erostyák, J., et al. (2015). Evidence for the role of lipid rafts and sphingomyelin in Ca $^{2+}$ -gating of Transient Receptor Potential channels in trigeminal sensory neurons and peripheral nerve terminals. *Pharmacol. Res.* 100, 101–116. doi:10.1016/j.phrs.2015.07.028
- Salas, M. M., Hargreaves, K. M., and Akopian, A. N. (2009). TRPA1-mediated responses in trigeminal sensory neurons: interaction between TRPA1 and TRPV1. *Eur. J. Neurosci.* 29, 1568–1578. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06702.x
- Sántha, P., Dobos, I., Kis, G., and Jancsó, G. (2020). Role of gangliosides in peripheral pain mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1005. doi:10.3390/ijms21031005
- Sauer, R.-S., Rittner, H. L., Roewer, N., Sohajda, T., Shityakov, S., Brack, A., et al. (2017). A novel approach for the control of inflammatory pain: prostaglandin E2 complexation by randomly methylated β -cyclodextrins. *Anesth. Analg.* 124, 675–685. doi:10.1213/ANE.0000000000001674
- Sharma, S. K., Vij, A. S., and Sharma, M. (2013). Mechanisms and clinical uses of capsaicin. *Eur. J. Pharmacol.* 720, 55–62. doi:10.1016/j.ejphar.2013.10.053
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 387, 569–572. doi:10.1038/42408
- Smart, D., Gunthorpe, M. J., Jerman, J. C., Nasir, S., Gray, J., Muir, A. I., et al. (2000). The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br. J. Pharmacol.* 129, 227–230. doi:10.1038/sj.bjp.0703050
- Sonnino, S., Aureli, M., Grassi, S., Mauri, L., Prioni, S., and Prinetti, A. (2014). Lipid rafts in neurodegeneration and neuroprotection. *Mol. Neurobiol.* 50, 130–148. doi:10.1007/s12035-013-8614-4
- Story, G. M., Peier, A. M., Reeve, A. J., Eid, S. R., Mosbacher, J., Hricik, T. R., et al. (2003). ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell.* 112, 819–829. doi:10.1016/S0092-8674(03)00158-2
- Szőke, E., Seress, L., and Szolcsányi, J. (2002). Neonatal capsaicin treatment results in prolonged mitochondrial damage and delayed cell death of B cells in the rat trigeminal ganglia. *Neuroscience.* 113, 925–937. doi:10.1016/s0306-4522(02)00208-7
- Szolcsányi, J. (2004). Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptides.* 38, 377–384. doi:10.1016/j.npep.2004.07.005
- Szolcsányi, J. (2008). Hot target on nociceptors: perspectives, caveats and unique features. *Br. J. Pharmacol.* 155, 1142–1144. doi:10.1038/bjp.2008.374
- Szolcsányi, J., Jancsó-Gábor, A., and Joó, F. (1975). Functional and fine structural characteristics of the sensory neuron blocking effect of capsaicin. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 287, 157–169. doi:10.1007/BF00510447
- Szolcsányi, J., and Sándor, Z. (2012). Multimeric TRPV1 nociceptor: a target for analgesics. *Trends Pharmacol.* 33, 646–655. doi:10.1016/j.tips.2012.09.002
- Szőke, E., Börzsei, R., Tóth, D. M., Lengel, O., Helyes, Z., Sándor, Z., et al. (2010). Effect of lipid raft disruption on TRPV1 receptor activation of trigeminal sensory neurons and transfected cell line. *Eur. J. Pharmacol.* 628, 67–74. doi:10.1016/j.ejphar.2009.11.052
- Tjølsen, A., Berge, O. G., Hunskaar, S., Rosland, J. H., and Hole, K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain.* 51, 5–17. doi:10.1016/0304-3959(92)90003-t
- Trevisani, M., Siemens, J., Materazzi, S., Bautista, D. M., Nassini, R., Campi, B., et al. (2007). 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 13519–13524. doi:10.1073/pnas.0705923104
- Vay, L., Gu, C., and McNaughton, P. A. (2012). The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *Br. J. Pharmacol.* 165, 787–801. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01601.x
- Vilceanu, D., and Stucky, C. L. (2010). TRPA1 mediates mechanical currents in the plasma membrane of mouse sensory neurons. *PLoS One.* 5, e12177. doi:10.1371/journal.pone.0012177
- Watanabe, S., Tan-No, K., Tadano, T., and Higashi, H. (2011). Intraplantar injection of gangliosides produces nociceptive behavior and hyperalgesia via a glutamate signaling mechanism. *Pain.* 152, 327–334. doi:10.1016/j.pain.2010.10.036
- Welch, J. M., Simon, S. A., and Reinhart, P. H. (2000). The activation mechanism of rat vanilloid receptor 1 by capsaicin involves the pore domain and differs from the activation by either acid or heat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 13889–13894. doi:10.1073/pnas.230146497

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Horváth, Payrits, Steib, Kántás, Biró-Sütő, Erostyák, Makkai, Sággy, Helyes and Szőke. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.