

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

Egyetemi doktori (PhD) tézis



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.

1. KUTATÁSI KONCEPCIÓ

A fájdalom csillapítása és a fájdalomcsillapító gyógyszerek felfedezése mind a mai napig igen fontos területe az orvosbiológiai 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 (1).

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. Kutatócsoportunk új megközelítése a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződéseken 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.

2. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. 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 szövetkárosodással 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), azonban megjegyzendő, hogy a TCM egyes tanai és módszerei a mai alternatív medicina gyakorlatának szerves részét képezik.

A XIV. században készült *Codex Ayasofya* összefoglalta a kor orvosi ismereteit, gyógynövényekkel kapcsolatos információkat és a gyógyítás során alkalmazott anyagokat. A következő nagy lépést Friedrich Sertürner munkája jelentette, aki 1817-ben elsőként izolálta a mákból (*Papaver somniferum*) származó ópiumból a morfiumot, amely később teret nyitott a ma is használatos major analgetikumok fejlesztésének. 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. 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-végződések alternatív befolyásolási lehetőségei is.

2.2. 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 neuropeptidek termelődnek, mint pl. a P anyag (Substance P), vagy a calcitonin 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 (2,3).

2.3. 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.*). Hőgyes Endre 1878-ban igazolta, hogy a részleges tisztaságú kapszaicin (CAPS) kivonat viszonylag szelektíven képes aktiválni a szenzoros idegvégződéseket (4). A CAPS-nel kapcsolatos farmakológiai kutatások Hőgyes megfigyelését követően háttérbe szorultak a XIX-XX. század vegetatív idegrendszerre ható szerekkel kapcsolatos kísérletei 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 (5). 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 érzőideg-végződésekből szabadulnak fel (6,7). További kísérleteik nyomán vetődött fel először egy specifikus CAPS receptor létezésének az ötlete, amelynek sematikus szerkezetéről két cikkben számoltak be (8,9). 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 (10,11). Újabb fejezetet nyitott meg az első CAPS antagonistá vegyületek szintézise, illetve egy másik vanilloid szerkezetű anyag, a reziniferatoxin (RTX) hatásának vizsgálata (12,13). Ekkoriban azt feltételezték, hogy két vanilloid receptor létezik, azonban Michael Jerry Caterina és munkatársai 1997-ben klónozták a CAPS receptort (14), 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.

2.4.A kapszaicin érzékeny idegvégződések működése

A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződések hármas 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, gyulladásgátló sejtek aktivációjával váltanak ki neurogén gyulladást a beidegzett területen. A harmadik, egy szisztémás efferens funkció, az aktiváció után az idegvégződésekől ugyanis szomatosztatin is felszabadul, ami a szisztémás keringésbe jutva a test távolabbi pontjain is szisztémás gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatást fejt ki. Az érzőideg-végződések e hármas funkcióját szenzokrin működésként definiálták (15).

2.5.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 (16): TRPC ("Canonical"), TRPV ("Vanilloid"), TRPM ("Melastatin"), TRPP ("Polycystin"), TRPML ("Mucolipin"), TRPA ("Ankyrin"), és TRPN ("NO-Mechano-Potential C"). 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. Ezt követően felfedezték, hogy a kérdéses receptor a TRPL alcsaládba tartozik. Később Michael Jerry Caterina és munkatársai klónozták és karakterizálták a TRPV1 receptort (14). 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 ankyrin domén (Ankyrin Repeated Domain, ARD), a TRP domén, az EF-kéz struktúrák, illetve egyéb jellemző képletek (16).

2.6.A TRPV1 szerkezete és funkciója

A CAPS receptor néven is ismert fehérje a TRP család többi tagjához hasonlóan hat transzmembrán 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 alcsaládra jellemző hatelemű ARD, amelynek funkcionális szerepe is van. A TRPV1 elsősorban a primer szenzoros neuronokon expresszálódik, de megtalálható számos extraneuronális szövetben is, mint pl. a keratinocitákban, hízósejtekben és a gasztrointesztinális rendszerben (16). 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 (13,17) – amelyek az S3 és S4 transzmembrán régiók közötti úgynevezett „vanilloid-zsebbe” (S505-T550) kötődnek. További fontos aminosavak a CAPS szempontjából a T511, S512 és W549, az RTX szempontjából pedig az M547. Egy másik növény családból, az *Allium* fajok közé tartozó fokhagymából származó allicin is aktiválja a TRPV1-et az N-terminális C157-es pozícióján keresztül. A növényi csípős anyagokon kívül számos állati toxin (pl. skorpiók és pókok mérgei) is TRPV1 aktivációt vált ki. 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, akárcsak az arachidonsav és egyéb zsírsav metabolitok. A fizikokémiai paraméterek közül az egyik legfontosabb a magas hőmérséklet (>43 °C), illetve az alacsony pH (<6) (14). 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 (18). 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 (19,20). További fontos antagonista hatással rendelkező anyagok az endogéneen megtalálható lipid mediátorok a rezolvinok (21).

2.7.A TRPA1 szerkezete és funkciója

A TRPA1 receptor elsősorban a DRG-ben és a trigeminális ganglionban (TG) fordul elő (22), de megtalálható extraneuronálisan is a keratinocitákban (23), illetve az enterokromaffin sejteken (24). A TRPA1 és TRPV1 kb. 30 %-ban ko-expresszálódik a kapszaicin-szenzitív szenzoros idegekben és elsősorban a fájdalom érzékelésben van szerepe (25). A receptor szerkezetével és a funkciót befolyásoló vegyületekkel kapcsolatos kutatások sok kihívást jelentenek, ugyanis a TRPA1 szerkezete fajoként bizonyos mértékben eltérő (26). Jellegzetes szerkezeti elem a 14-18 elemből álló ARD, amely több, a csatorna aktiváció szempontjából fontos kötődési helyet biztosít (27). A TRPV1-hez hasonlóan exogén és endogén ligandok is képesek aktiválni a TRPA1-et, az exogén agonisták jelentős része kémia irritáns, pl. az allil-izotiocianát, a formaldehid, az allicin, a fahéjaldehid és a mentol (28,29). Az endogén agonisták közül számos vegyület gyulladási folyamatok eredményeképpen képződik, pl. a metilglioxál, hidrogén-peroxid vagy a 4-hidroxi-nonenal (30). Ezekon 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 (22,31). Az antagonisták hatású vegyületek közül említést kell tenni a HC-030031-ről, az SZV-1287 vegyületről, amely egy komplex hatásmechanizmusú, TRPA1/TRPV1 antagonisták és szemikarbazid-szenzitív amin-oxidáz hatással rendelkező anyag (32,33).

2.8. A sejtmembrán szerkezete és a lipid raft modell

A sejtmembránok klasszikus fluid-mozaik modelljét Singer és Nicolson publikálta 1972-ben (34). 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 hidrofíli feje része a vizes fázis felé, a hidrofób farki része pedig a membrán belseje, azaz a másik lipofíli 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) azt (35).

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. Ennek magyarázatára alkotta meg Simons és Ikonen az úgynevezett lipid raft elméletet (36), 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 szfingomielinokban és glikoszfingolipidekben gazdag, míg az intracelluláris oldalon inkább glicerofosfolipidek helyezkednek el. A koleszterin – mint a struktúra integritásáért felelős fő komponens – egyenletes elosztottságot mutat (36). Ez a nagy fokú strukturális szervezethez vezet, ami azt eredményezi, hogy a raft régiók eltérő fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek a membrán egyéb régióitól. Ilyen jellegzetes tulajdonság pl. az, hogy nem ionos detergensekben (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 (37).

2.9.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 (38). Ezen kívül számos gyulladásos folyamatban is regulátor szereppel bírnak, ezért Miller és munkatársai bevezették az „inflammaraft” fogalmát (39). Bizonyított továbbá, hogy számos ioncsatorna, köztük több TRP receptor (40–42), valamint számos *malignus* daganattípussal összefüggésbe hozott fehérje is a raft régiókban helyezkedik el (38). 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 sejtbe történő penetrációjában vesznek részt. A patogének bejuttatásán túl azonban terápiás lehetőségeket is rejt a kaveolák működése, hiszen akár nagymolekulájú gyógyszeranyagok célba juttatása is megvalósítható ezeken keresztül (43).

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 (44). Funkciójukat tekintve a membránreceptorok klaszterizációjában van szerepük, pl. a CD40/CD40 ligand, illetve CD95/CD95 ligand jeltátviteli folyamatait szabályozzák (44). További speciális csoportot képeznek a gangliozidokban gazdag raftok, amelyek többek között a különböző toxinok sejtbé történő bejutásában, valamint az Alzheimer betegség molekuláris patomechanizmusában játszanak szerepet (45)

2.10. A lipid raftok farmakológiai vizsgálata

A lipid raftok farmakológiai vizsgálata az elmúlt évtizedben jelentős szerepet töltött be az alapkutatásokban, 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, amely zárványkomplexet képez a koleszterinnel. A raftok szfingomielin tartalma is elbontható enzimatikusan SMáz-zal, ami foszfokolinná és ceramiddá alakítja a szfingomielineket. 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. 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) (46), azonban gátlódnak a protonok és CAPS által kiváltott áramok DRG neuronokon (40). Vizsgálták egyéb ligandok, pl. a 3 [H]RTX TRPV1 receptorhoz való kötődését is, azonban ezt nem befolyásolta a koleszterin depléciója. Az MCD hatását vizsgálták egyéb TRP ioncsatornák aktivációjára is, 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 (47,48). Hasonló hatásokat írtak le később a SMáz enzimmal is (49).

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 (41,42). 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 (50,51). 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 komplett Freund-adjuváns kiváltotta termális allodíniát és mechanikai hiperalgéziát patkányokban (52). Az MCD hatékonyan csillapítja a hiperalgéziát az RTX által kiváltott neuropátia egérmodelljében (53), valamint prosztagalndin E2 adását követően patkányokban (54). 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 (55).

3. 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. 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. Szingolipid depléció hatásának vizsgálata a TRPV1 és TRPA1 ioncsatornák aktiválhatóságára *in vivo***
- 3. Koleszterin depléció hatásának vizsgálata a TRPV1 és TRPA1 ioncsatornák aktiválhatóságára *in vivo***

4. KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

4.1. 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 (56). Alkalmazásával mind a membránok polarizáltsága, mind a fluiditása vizsgálható. 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 FL3-2iHR spektrofluoriméterrel (HORIBA Jobin-Yvon NanoLog) 4 mm-es úthosszúságú kvarcküvetékben (Hellma 104F-QS) végeztük rögzített, 20 °C-os hőmérsékleten.

4.1.1. Membránpolaritás vizsgálata

A membrán polarítására – 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 (57). A gerjesztési spektrumok felvételekor 300 és 420 nm között, míg az emissziós spektrumok esetén 380 és 600 nm között változott a hullámhossz.

4.1.2. Membránfluiditás vizsgálata

A membránfluiditás vizsgálatához az emissziós spektrum 410-540 nm közötti tartományának 14 lecsengési görbéjét ($\Delta\lambda = 10$ nm) vettük fel, 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 (58).

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 membránviszkózitással 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 (59,60). 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 (61). Éppen ezért a kapott eredmények kiértékelését kvalitatív módon végeztük el, a változás irányából relatív következtetések vontunk le.

4.2. CAPS-kiváltotta akut kemonocéptív reakció modell

Vizsgálatainkban CAPS oldatot (20 μ L, 30 μ g/mL) cseppentettünk az állatok jobb szemébe, majd egy üvegalitkába helyezve őket 1 percen keresztül számoltuk a szemtörlések számát (62). 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.

4.3. RTX-indukálta termális allodínia és mechanikai hiperalgédia modell

Az ultrapotens, szelektív TRPV1 agonista RTX (20 μ L, 0,1 μ g/mL) jobb hátsó talpba injektálásával akut neurogén gyulladáshoz vezetett ki, amelyben perifériás mechanizmusok révén termális allodínia, komplex perifériás és centrális mechanizmusok révén pedig mechanikai hiperalgédia alakul ki (63). 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 (64).

4.3.1. 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.

4.3.2. 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 tüvel 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 mechanonociceptív 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.

4.4. Formalin-kiváltotta akut gyulladáshoz vezető fájdalom modell

A modellben a TRPA1 aktiváló formalint (20 µL, 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 gyulladáshoz vezető folyamatok tartják fent a fájdalmat (65,66).

4.5. Etikai vonatkozások

A CAPS kiváltotta akut kemonoczeptív reakció vizsgálatához 12-16 hetes hím C57BL/6, míg az RTX indukálta termális allodínia és mechanikai hiperalgécia, valamint a formalin által kiváltott akut gyulladáshoz azonos korú és nemű NMRI egereket használtunk. Az állatokat a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetének 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/dimetil-szulfoxiddal (DMSO) kétszer kezelt és anyaggal, majd fiziológiás sóoldattal kezelt) kontrollként szolgált a szűrés okozta, illetve az anyag önálló hatásaként esetlegesen fellépő fájdalom vizsgálatára. A statisztikai analízishez a két azon 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.

4.6. 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 varianciaanalízis (ANOVA – analysis of variance) 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.

5. EREDMÉNYEK

5.1. A lipid raftok integritásváltozásának vizsgálata a sejtmembrán polaritására és fluiditására

5.1.1. A szfingomielináz és myriocin 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. 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 mikrokönyezet – zártabbá vált a membrán – a kezeletlen (kontroll) mintához képest.

5.1.2. 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 Myr kivételével minden esetben megállapítható, hogy a kezelés hatására a GP függvények értéke csökkent, ami a színekép 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 mikrokönyezetét. 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 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.

5.2. Szfingolipid depléciónak hatásának vizsgálata a TRPV1 és TRPA1 ioncsatornák aktiválhatóságára *in vivo*

5.2.1. A szfingomielináz és myriocin hatása a kapszaicin kiváltotta akut kemonociceptív reakcióban

Az 50 mU SMáz előkezelés hatására szignifikánsan csökkent a CAPS kiváltotta szemtörlések száma a vizsgálat első órájában a fizioiógias sóoldattal előkezelt kontrollcsoporttal összehasonlítva. Az 1 mM Myr előkezelés hatására szignifikáns csökkenést mutattunk ki a DMSO-val előkezelt csoportban a CAPS szembe cseppentését követően a vizsgálat első és második órájában is. A DMSO egyszeri szembe cseppentése nem okozott deszenzibilizáló hatást.

5.2.2. A szfingomielináz és myriocin hatása a reziniferatoxin (RTX) indukálta akut termális allodíniára és mechanikai hiperalgziára

Az RTX hatására kialakuló termális allodíniát a vizsgálat 10., 20. és 30. percében szignifikánsan csillapította az 50 mU SMáz előkezelés a fizioiógias sóoldattal szemben. Továbbá a kialakuló mechanikai hiperalgziára is szignifikáns hatást fejtett ki az SMáz a vizsgálat 30. percében. Az 1 mM Myr-nal történő előkezelés a DMSO-val előkezelt csoporthoz viszonyítva szignifikánsan gátolta az RTX hatására kialakuló hőküszöb csökkenést a 10. és 20. percekben, azonban a 30. percben már nem volt hatása, továbbá nem befolyásolta egyik időpontban sem a kialakuló mechanikai hiperalgziát. A DMSO egyszeri alkalmazása nem okozott deszenzibilizáló hatást.

5.2.3. A szfingomielináz és myriocin hatása a formalin indukálta akut gyulladásos fájdalomra

Az 50 mU SMáz előkezelés nem befolyásolta a formalin indukálta akut gyulladásos fájdalom I. fázisának reakcióidejét, azonban szignifikánsan csökkentette a II. fázis időtartamát a fizioiógias sóoldattal történő előkezeléssel összehasonlítva. Ezzel szemben az 1 mM Myr előkezelés nem befolyásolta egyik fázis időtartamát sem a DMSO előkezeléssel szemben. A DMSO egyszeri alkalmazása nem okozott deszenzibilizáló hatást.

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

5.3.1. A metil- β -ciklodextrin és a C1 karboxamido-szteroid hatása a kapszaicin kiváltotta akut kemonoczeptív reakcióban

Az 15 mM MCD előkezelés hatására szignifikánsan csökkent a CAPS kiváltotta szemtörlések száma a vizsgálat első órájában a fiziológiás sóoldattal előkezelt kontrollcsoporttal összehasonlítva. A 100 μ M C1 előkezelés hatására szignifikáns csökkenést mutattunk ki a fiziológiás sóoldattal előkezelt csoporttal szemben a CAPS szembe cseppentését követően a vizsgálat első és második órájában is.

5.3.2. A metil- β -ciklodextrin és a C1 karboxamido-szteroid hatása a reziniferatoxin (RTX) indukálta akut termális allodíniára és mechanikai hiperalgziára

A 15 mM MCD előkezelés nem befolyásolta szignifikánsan az RTX hatására kialakuló termális allodíniát, sem pedig a mechanikai hiperalgziát a fiziológiás kontrollcsoporttal összehasonlítva. A 100 μ M C1 az MCD-hez hasonlóan nem volt hatással az RTX kiváltotta hőküszöb csökkenésre, azonban szignifikánsan csillapította a mechanikai hiperalgziát a vizsgálat 60. és 90. percében. Ebben a modellben megvizsgáltuk, hogy van-e dóziszfüggő hatása a C1-nek a termális allodíniára, ezért 500 μ M-os koncentrációt is alkalmaztunk. Az 500 μ M C1-nek azonban szintén nem volt befolyásoló hatása a hőküszöb változására, azonban szignifikánsan gátolta a mechanikai hiperalgézia kialakulását az összes vizsgált időpontban.

5.3.3. A metil- β -ciklodextrin és a C1 karboxamido-szteroid hatása a formalin indukálta akut gyulladásoos fájdalomra

A 15 mM MCD előkezelés nem befolyásolta a formalin indukálta akut gyulladásoos fájdalom I. fázisának reakcióidejét, azonban szignifikánsan csökkentette a II. fázis időtartamát a fiziológiás sóoldattal történő előkezeléssel összehasonlítva. Az MCD-hez hasonlóan a 100 μ M C1 előkezelés sem befolyásolta az I. fázis időtartamát, azonban szignifikánsan csökkentette a II. fázis hosszúságát.

6. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

A TRPV1 és TRPA1 ioncsatornák kiemelt fontosságúak számos fiziológiai és patofiziológiai folyamatban egyaránt (16), mégis a gyógyszerkutatás szempontjából a neuropátiás fájdalomban betöltött szerepük a legfontosabb. Multimodális receptor tulajdonságuk miatt rengeteg anyag képes befolyásolni a működésüket, azonban a klasszikus antagonistá hatású vegyületek fejlesztése sok problémába ütközött a mellékhatások miatt (67). Egyedüli készítményként a 8 % kapszaicin tartalmú tapaszt (Qutenza®) alkalmazzuk terápiásan övsömört követő, illetve *diabetes*-es neuropátia kezelésére (68). Ennek a készítménynek a hatásmechanizmusa a TRPV1 receptor tartós deszenzibilizálódásán alapul (69). 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 (36). A lipid tutajok meghatározott mikrodomének, amelyek koleszterinben, szfingolipidekben és gangliozidokban gazdagok (36) 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 - (41,42,51). 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 (56). Ezen túl az időbontott emissziós spektrum lecsengési görbéjének jellemző paramétereivel – GP, CoG és τ_{rot} – jellemezhetjük a fluiditást (58–60). Kutatócsoportunk korábban bizonyította, hogy a koleszterint depletáló MCD és C1 megváltoztatja a sejtmembrán polaritását (42,51). Jelenlegi vizsgálatainkban a szfingomielin 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 jelentős 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 (48). 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 (70). 5 percig tartó 2,5 μ M 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 (70,71). Az eredmények különbözősége feltételezhetően a koncentráció különbségből (az általunk alkalmazott 100 nM vs. 2,5 μ M), 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 Laurdan 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 (72,73). A Myr esetében a fent említett glicerofosfolipid képződéssel járó folyamatok állhatnak a háttérben (70,71), míg a C1 esetében a koleszterinhez hasonló szerkezettel lehet magyarázni az oldószer relaxáció lassulását, ugyanis bizonyos szerkezeti hasonlóságok miatt szubsztituálhatja a koleszterint a membránban ezzel okozva a spektrális eltolódás lassulását.

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 ionsatornák 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 (41,42,51). 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 az első órában. Továbbá a Myr a második órában is hatékonynak bizonyult (32%-os csökkenés), amihez hozzájárulhat a hosszan tartó és komplex hatásmechanizmusa is (74). 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 (63). Ezzel szemben a Myr csak a hőküszöb csökkenését tudta csökkenteni. A TRPA1-et aktiváló formalin esetében a jellemző kétfázisú reakcióban (65) 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 kontrollcsoporthoz 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 szentörlések 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 (40,41). Néhány állatkísérletes bizonyíték van az MCD és egyéb ciklodextrinek (pl. RAMEB) hatására (52,54). A saját kutatásom szempontjából kiemelendő Lin és munkatársai munkája, amelyben az MCD RTX-indukálta mononeuropátia egérmódeljében kifejtett hatásait írják le (53). A szerzők kiemelik, hogy a TRPV1 gátló hatásban feltételezhetően a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát és a prosztataspecifikus savanyú foszfatáz is szerepet játszik (53).

Korábbi *in vitro* eredményeinkre alapozva (42,50,51) 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 szentörlések 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 gyulladáshoz 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 dehidroepiandrosteron csökkenti a CAPS által kiváltott áramokat primer szenzoros neuronon (75), 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 -ösztradiol és dehidroepiandrosteron-szulfát gyenge gátló hatással bírt. Ebből a vizsgálatból egyértelműen levonható az a következtetés, hogy az egyes szteroid vegyületeknél kiemelt fontosságú a sztereo-szelektivitás (76). Kutatócsoportunk bizonyította, hogy az ösztradiol a tropomioszin receptor kináz A mediálta útvonalon szenzitizálja a TRPV1-et (77).

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 (41), 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 háttérében 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, és a koleszterinről leírták, hogy a koleszterin felismerő aminosav motívum-on (cholesterol recognition amino-acid consensus motif – CRAC) keresztül közvetlenül is képes gátolni a TRPV1 CAPS, hő és feszültség által kiváltott áramait (78).

7. 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.
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.

Anyag	CAPS-kiváltotta akut kemonocicepció	RTX-indukálta termális allodínia	RTX-indukálta mechanikai hiperalgécia	Formalin-indukálta akut gyulladásos 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

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 ionszatórnák 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 gyógyszer-célpont hozzájárulhatnak új hatásmechanizmusú – elsősorban topikális alkalmazású – készítmények fejlesztéséhez.

8. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

1. Botz B, Bölcskei K, Helyes Z. Challenges to develop novel anti-inflammatory and analgesic drugs: Novel anti-inflammatory and analgesic drugs. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2017 May;9(3):e1427.
2. Gyires Klára, Fürst Zsuzsanna. *A farmakológia alapjai.* Medicina; 2011.
3. Fonyó Attila, Kollai Márk. *Az orvosi élettan tankönyve.* Budapest: Medicina; 2014.
4. Högyes E. Beitrage Zur physiologischen Wirkung der Bestandteile des Capsicum annum. *Arch Exp Pathol Pharmacol.* 1878;(9.):117–30.
5. Jancsó M. *Speicherung. Stoffanreicherung in Retikuloendothel und in der Niere.* Akadémiai Kiadó; 1955.
6. Jancsó N, Jancsó-Gábor A, Szolcsányi J. DIRECT EVIDENCE FOR NEUROGENIC INFLAMMATION AND ITS PREVENTION BY DENERVATION AND BY PRETREATMENT WITH CAPSAICIN. *Br J Pharmacol Chemother.* 1967 Sep;31(1):138–51.
7. Jancsó N, Jancsó-Gábor A, Szolcsányi J. 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.* 1968 May;33(1):32–41.
8. Szolcsányi J, Jancsó-Gábor A. Sensory effects of capsaicin congeners I. Relationship between chemical structure and pain-producing potency of pungent agents. *Arzneimittelforschung.* 1975;25(12):1877–81.
9. Szolcsányi J, Jancsó-Gábor A. Sensory effects of capsaicin congeners. Part II: Importance of chemical structure and pungency in desensitizing activity of capsaicin-type compounds. *Arzneimittelforschung.* 1976;26(1):33–7.
10. Szolcsányi J, Barthó L. New type of nerve-mediated cholinergic contractions of the guinea-pig small intestine and its selective blockade by capsaicin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1978;305(1):83–90.
11. Szolcsányi J, Barthó L. Capsaicin-sensitive innervation of the guinea-pig taenia caeci. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1979 Oct;309(1):77–82.
12. Bevan S, Szolcsányi J. Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. *Trends Pharmacol Sci.* 1990 Aug;11(8):331–3.
13. Szallasi A, Blumberg PM. Specific binding of resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog, by dorsal root ganglion membranes. *Brain Res.* 1990 Jul;524(1):106–11.
14. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 1997 Oct;389(6653):816–24.
15. Szolcsányi J, Sándor Z, Pethő G, Varga A, Bölcskei K, Almási R, et al. 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.* 2004 May;361(1–3):155–8.
16. Nilius B, Owsianik G. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol.* 2011;12(3):218.
17. Szallasi A, Blumberg PM. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev.* 1999 Jun;51(2):159–212.
18. Winter Z, Buhala A, Ötvös F, Jósvey K, Vizler C, Dombi G, et al. Functionally Important Amino Acid Residues in the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) Ion Channel - An Overview of the Current Mutational Data. *Mol Pain.* 2013 Jun 22;9:1744-8069-9–30.
19. Bevan S, Hothi S, Hughes G, James IF, Rang HP, Shah K, et al. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br J Pharmacol.* 1992 Oct;107(2):544–52.
20. Oláh Z, Rédei D, Pecze L, Vizler C, Jósvey K, Forgó P, et al. Pellitorine, an extract of *Tetradium daniellii*, is an antagonist of the ion channel TRPV1. *Phytomedicine.* 2017 Oct;34:44–9.
21. Park CK, Xu ZZ, Liu T, Lu N, Serhan CN, Ji RR. 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.* 2011 Dec 14;31(50):18433–8.

22. Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, et al. ANKTM1, a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons, Is Activated by Cold Temperatures. *Cell*. 2003 Mar;112(6):819–29.
23. Atoyán R, Shander D, Botchkareva NV. Non-Neuronal Expression of Transient Receptor Potential Type A1 (TRPA1) in Human Skin. *J Invest Dermatol*. 2009 Sep;129(9):2312–5.
24. Nozawa K, Kawabata-Shoda E, Doihara H, Kojima R, Okada H, Mochizuki S, et al. TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2009 Mar 3;106(9):3408–13.
25. Salas MM, Hargreaves KM, Akopian AN. TRPA1-mediated responses in trigeminal sensory neurons: interaction between TRPA1 and TRPV1. *Eur J Neurosci*. 2009 Apr;29(8):1568–78.
26. Chen J, Kym PR. TRPA1: the species difference. *J Gen Physiol*. 2009 Jun 1;133(6):623–5.
27. Julius D. TRP Channels and Pain. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2013 Oct 6;29(1):355–84.
28. Macpherson LJ, Geierstanger BH, Viswanath V, Bandell M, Eid SR, Hwang S, et al. The Pungency of Garlic: Activation of TRPA1 and TRPV1 in Response to Allicin. *Curr Biol*. 2005 May;15(10):929–34.
29. Bautista DM, Pellegrino M, Tsunozaki M. TRPA1: A Gatekeeper for Inflammation. *Annu Rev Physiol*. 2013 Feb 10;75(1):181–200.
30. Trevisani M, Siemens J, Materazzi S, Bautista DM, Nassini R, Campi B, et al. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc Natl Acad Sci*. 2007 Aug 14;104(33):13519–24.
31. Vilceanu D, Stucky CL. TRPA1 Mediates Mechanical Currents in the Plasma Membrane of Mouse Sensory Neurons. Premkumar LS, editor. *PLoS ONE*. 2010 Aug 16;5(8):e12177.
32. Payrits M, SÁghy É, Mátyus P, Czompa A, Ludmerczki R, Deme R, et al. 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*. 2016 Jun;324:151–62.
33. Horváth Á, Tékus V, Bencze N, Szentes N, Scheich B, Bölcskei K, et al. 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*. 2018 May;131:231–43.
34. Singer SJ, Nicolson GL. 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*. 1972 Feb 18;175(4023):720–31.
35. Pálfia Z, Kristóf Z. *A sejtbiológiai alapjai*. ELTE; 2013.
36. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 1997 Jun;387(6633):569–72.
37. Brown DA, London E. Structure and Function of Sphingolipid- and Cholesterol-rich Membrane Rafts. *J Biol Chem*. 2000 Jun;275(23):17221–4.
38. Sezgin E, Levental I, Mayor S, Eggeling C. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017 Jun;18(6):361–74.
39. Miller YI, Navia-Pelaez JM, Corr M, Yaksh TL. Lipid rafts in glial cells: role in neuroinflammation and pain processing. *J Lipid Res*. 2020 May;61(5):655–66.
40. Liu M, Huang W, Wu D, Priestley JV. TRPV1, but not P2X₃, requires cholesterol for its function and membrane expression in rat nociceptors. *Eur J Neurosci*. 2006 Jul;24(1):1–6.
41. Szőke É, Börzsei R, Tóth DM, Lengl O, Helyes Z, Sándor Z, et al. Effect of lipid raft disruption on TRPV1 receptor activation of trigeminal sensory neurons and transfected cell line. *Eur J Pharmacol*. 2010 Feb;628(1–3):67–74.
42. SÁghy É, Szőke É, Payrits M, Helyes Z, Börzsei R, Erostyák J, et al. 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*. 2015 Oct;100:101–16.
43. Imre N, Hetényi A, Szabó E, Bodnár B, Szkalitsy A, Gróf I, et al. Routing Nanomolar Protein Cargoes to Lipid Raft-Mediated/Caveolar Endocytosis through a Ganglioside GM1-Specific Recognition Tag. *Adv Sci*. 2020 Feb;7(4):1902621.

44. Zhang Y, Li X, Becker KA, Gulbins E. Ceramide-enriched membrane domains—Structure and function. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 2009 Jan;1788(1):178–83.
45. Hicks DA, Nalivaeva NN, Turner AJ. Lipid Rafts and Alzheimer’s Disease: Protein-Lipid Interactions and Perturbation of Signaling. *Front Physiol* [Internet]. 2012 [cited 2022 Jun 20];3. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2012.00189/abstract>
46. Liu B, Hui K, Qin F. Thermodynamics of Heat Activation of Single Capsaicin Ion Channels VR1. *Biophys J.* 2003 Nov;85(5):2988–3006.
47. Startek J, Boonen B, Talavera K, Meseguer V. TRP Channels as Sensors of Chemically-Induced Changes in Cell Membrane Mechanical Properties. *Int J Mol Sci.* 2019 Jan 16;20(2):371.
48. Startek JB, Boonen B, López-Requena A, Talavera A, Alpizar YA, Ghosh D, et al. Mouse TRPA1 function and membrane localization are modulated by direct interactions with cholesterol. *eLife.* 2019 Jun 11;8:e46084.
49. Startek JB, Talavera K. Lipid Raft Destabilization Impairs Mouse TRPA1 Responses to Cold and Bacterial Lipopolysaccharides. *Int J Mol Sci.* 2020 May 28;21(11):3826.
50. Szánti-Pintér E, Wouters J, Gömöry Á, Sággy É, Szőke É, Helyes Z, et al. Synthesis of novel 13 α -18-norandrostane–ferrocene conjugates via homogeneous catalytic methods and their investigation on TRPV1 receptor activation. *Steroids.* 2015 Dec;104:284–93.
51. Sággy É, Payrits M, Bíró-Sütő T, Skoda-Földes R, Szánti-Pintér E, Erostyák J, et al. Carboxamido steroids inhibit the opening properties of transient receptor potential ion channels by lipid raft modulation. *J Lipid Res.* 2018 Oct;59(10):1851–63.
52. Sauer RS, Rittner HL, Roewer N, Sohajda T, Shityakov S, Brack A, et al. A Novel Approach for the Control of Inflammatory Pain: Prostaglandin E2 Complexation by Randomly Methylated β -Cyclodextrins. *Anesth Analg.* 2017 Feb;124(2):675–85.
53. Lin CL, Chang CH, Chang YS, Lu SC, Hsieh YL. Treatment with methyl- β -cyclodextrin prevents mechanical allodynia in resiniferatoxin neuropathy in a mouse model. *Biol Open.* 2019 Jan 15;8(1):bio039511.
54. Ferrari LF, Levine JD. Plasma Membrane Mechanisms in a Preclinical Rat Model of Chronic Pain. *J Pain.* 2015 Jan;16(1):60–6.
55. Watanabe S, Tan-No K, Tadano T, Higashi H. Intraplantar injection of gangliosides produces nociceptive behavior and hyperalgesia via a glutamate signaling mechanism: *Pain.* 2011 Feb;152(2):327–34.
56. Gaus K, Gratton E, Kable EPW, Jones AS, Gelissen I, Kritharides L, et al. Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy. *Proc Natl Acad Sci.* 2003 Dec 23;100(26):15554–9.
57. Golfetto O, Hinde E, Gratton E. Laurdan Fluorescence Lifetime Discriminates Cholesterol Content from Changes in Fluidity in Living Cell Membranes. *Biophys J.* 2013 Mar;104(6):1238–47.
58. Sanchez SA, Tricerri MA, Gratton E. Laurdan generalized polarization fluctuations measures membrane packing micro-heterogeneity in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 2012 May 8;109(19):7314–9.
59. Ma Y, Benda A, Kwiatek J, Owen DM, Gaus K. Time-Resolved Laurdan Fluorescence Reveals Insights into Membrane Viscosity and Hydration Levels. *Biophys J.* 2018 Oct;115(8):1498–508.
60. Steinmark IE, Chung P, Ziolk RM, Cornell B, Smith P, Levitt JA, et al. Time-Resolved Fluorescence Anisotropy of a Molecular Rotor Resolves Microscopic Viscosity Parameters in Complex Environments. *Small.* 2020 Jun;16(22):1907139.
61. Balogh G, Maulucci G, Gombos I, Horváth I, Török Z, Péter M, et al. Heat Stress Causes Spatially-Distinct Membrane Re-Modelling in K562 Leukemia Cells. Csermely P, editor. *PLoS ONE.* 2011 Jun 16;6(6):e21182.
62. Szőke E, Seress L, Szolcsányi J. Neonatal capsaicin treatment results in prolonged mitochondrial damage and delayed cell death of B cells in the rat trigeminal ganglia. *Neuroscience.* 2002;113(4):925–37.
63. Pan HL, Khan GM, Alloway KD, Chen SR. Resiniferatoxin Induces Paradoxical Changes in Thermal and Mechanical Sensitivities in Rats: Mechanism of Action. *J Neurosci.* 2003 Apr 1;23(7):2911–9.

64. Almási R, Pethő G, Bölcskei K, Szolcsányi J. Effect of resiniferatoxin on the noxious heat threshold temperature in the rat: a novel heat allodynia model sensitive to analgesics. *Br J Pharmacol*. 2003 May;139(1):49–58.
65. Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. 1992 Oct;51(1):5–17.
66. Bölcskei K, Helyes Z, Szabó Á, Sándor K, Elekes K, Németh J, et al. Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice: *Pain*. 2005 Oct;117(3):368–76.
67. Szolcsányi J, Sándor Z. Multimeric TRPV1 nociceptor: a target for analgesics. *Trends Pharmacol Sci*. 2012 Dec;33(12):646–55.
68. Treede RD, Wagner T, Kern KU, Husstedt IW, Arendt G, Birklein F, et al. 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*. 2013 May;29(5):527–38.
69. Sharma SK, Vij AS, Sharma M. Mechanisms and clinical uses of capsaicin. *Eur J Pharmacol*. 2013 Nov;720(1–3):55–62.
70. Monasterio BG, Jiménez-Rojo N, García-Arribas AB, Riezman H, Goñi FM, Alonso A. Plasma membrane effects of sphingolipid-synthesis inhibition by myriocin in CHO cells: a biophysical and lipidomic study. *Sci Rep*. 2022 Dec;12(1):955.
71. Merrill AH, Schmelz EM, Dillehay DL, Spiegel S, Shayman JA, Schroeder JJ, et al. Sphingolipids—The Enigmatic Lipid Class: Biochemistry, Physiology, and Pathophysiology. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1997 Jan;142(1):208–25.
72. Chao L, Chen F, Jensen KF, Hatton TA. Two-Dimensional Solvent-Mediated Phase Transformation in Lipid Membranes Induced by Sphingomyelinase. *Langmuir*. 2011 Aug 16;27(16):10050–60.
73. Jiang XC, Li Z, Yazdanyar A. Sphingolipids and HDL Metabolism. In: *The HDL Handbook* [Internet]. Elsevier; 2014 [cited 2022 Apr 18]. p. 133–58. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124078673000068>
74. Wadsworth JM, Clarke DJ, McMahon SA, Lowther JP, Beattie AE, Langridge-Smith PRR, et al. The Chemical Basis of Serine Palmitoyltransferase Inhibition by Myriocin. *J Am Chem Soc*. 2013 Sep 25;135(38):14276–85.
75. Chen SC, Chang TJ, Wu FS. Competitive Inhibition of the Capsaicin Receptor-Mediated Current by Dehydroepiandrosterone in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 Nov;311(2):529–36.
76. Majeed Y, Amer M, Agarwal A, McKeown L, Porter K, O'Regan D, et al. Stereo-selective inhibition of transient receptor potential TRPC5 cation channels by neuroactive steroids: TRPC5 inhibition by steroids. *Br J Pharmacol*. 2011 Apr;162(7):1509–20.
77. Payrits M, Sághy É, Cseko K, Pohóczky K, Bölcskei K, Ernszt D, et al. Estradiol Sensitizes the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Receptor in Pain Responses. *Endocrinology*. 2017 01;158(10):3249–58.
78. Morales-Lázaro SL, Rosenbaum T. Cholesterol as a Key Molecule That Regulates TRPV1 Channel Function. In: Rosenhouse-Dantsker A, Bukiya AN, editors. *Direct Mechanisms in Cholesterol Modulation of Protein Function* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [cited 2020 Apr 28]. p. 105–17. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 1135). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-14265-0_6

9. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

9.1. 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 sphingomyelinase 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

9.2. 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 Somatostatin 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. 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 munkámat. 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 szorosán együtt működünk az összes kísérletünk során, valamint Biró-Sütő Tündének, Önböli Gyuláné Dórinak és Disztl Cecéliának, 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.