

MTA Doktori Értekezés tézisei

A kapszaicin receptor (TRPV1) farmakológiája és keringésélettani szerepe

Tóth Attila

Debrecen, 2013

A kapszaicin receptor (TRPV1) farmakológiája és keringésélettani szerepe

Tóth Attila



Debreceni Egyetem
Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Általános Orvostudományi Kar
Kardiológiai Intézet
Klinikai Fiziológiai Tanszék
Debrecen, 2013

Tartalomjegyzék

• 1. Bevezetés.....	4
1.1. A kapszaicin.....	4
1.2. A kapszaicin receptor.....	4
1.3. A klónozott TRPV1.....	6
1.4. A TRPV1 élettani jelentősége.....	7
1.5. A TRPV1 mint gyógyszercélpont.....	10
• 2. Eredmények.....	11
2.1. A TRPV1-en ható, természetben előforduló ligandok azonosítása, jellemzése.....	11
2.1.1. A thapsigargin mint egy természetben előforduló TRPV1 antagonistá.....	11
2.1.2. N-arachidonil dopamin (NADA), mint TRPV1 ligand.....	13
2.2. A TRPV1 molekuláris farmakológiája.....	14
2.2.1. Parciális agonisták.....	15
2.2.2. TRPV1 antagonisták: vezérmolekulák és modalitás a hatékonyságban.....	16
2.3.3. Molekulafejlesztés.....	17
2.3. A TRPV1 ligandkötő helyének pozíciója.....	21
2.4. Modalitások a TRPV1 kapszaicin kötő helyén.....	22
2.5. A vaszkuláris TRPV1.....	26
• 3. Az új eredmények összefoglalása.....	33
• 4. Megbeszélés, az eredmények potenciális hasznosítása.....	34
• 5. Publikációk, szabadalmi beadvány.....	44
5.1. Szabadalmi beadvány.....	44
5.2. Az értekezésben felhasznált saját közlemények.....	45
5.2.1. Az értekezést megalapozó összefoglaló közlemény.....	45
5.2.2. Az értekezést megalapozó eredeti közlemények.....	45
5.3. Az értekezéshez szorosan nem kötődő egyéb eredeti közlemények.....	47
5.4. Összefoglaló scientometria adatok.....	49
• 6. Köszönetnyilvánítás.....	50

1. Bevezetés

1.1. A kapszaicin

A kapszaicin a paprika (*Capsicum annuum*) csípősségét adó alkotója. A kapszaicin elnevezés a vegyületet először izoláló Thresh-től származik (Thresh 1846), aki már ekkor megjósolta, hogy az általa izolált vegyület szerkezetileg hasonló a vanillinhez. Ennek igazolására 1919-ben került sor (Nelson 1919). A kapszaicin kémiai szerkezetét tekintve 8-metil-N-vanillil-6-nonénamid, összegképlete $C_{18}H_{27}O_3N$. A kapszaicin szintézisének leírása először 1930-ban történt meg (Spaeth, Darling 1993).

Magyarország és a kapszaicin kapcsolata nagyon szorosnak mondható. Magyar kutatók mindig is élen jártak a kapszaicin hatásainak tanulmányozásában, továbbá a magyar klíma megfelelőnek bizonyult a paprika termesztésére is. Így a magyar paprika termelés a paprika fűszeripari felhasználásának nagy lökést adott és talán ennek volt köszönhető, hogy számos nyelvben a *Capsicum annuum* tudományos nevű növényt paprikának nevezik.

1.2. A kapszaicin receptor

A kapszaicin hatásainak tudományos alapossggal történő feldolgozása és leírása először Högyes Endrénél történt meg (Högyes 1878), aki megállapította, hogy a kapszaicin elsősorban az érzőidegekre hat. A kapszaicin és receptorának kutatása ezt követően is sokáig magyar sajátosság maradt. A II. világháborút követően a hazai kutatócsoportok közül kiemelkedett Jancsó Miklós kutatócsoportja a Szegedi Egyetemen. Mérföldkövet jelentő felismerése volt, hogy a kapszaicinnal kezelt állatok bizonyos körülmények között elveszítik kapszaicin válaszkészségüket. Ezt a jelenséget kapszaicin deszenzibilizációnak nevezték el (Jancsó 1960). Ugyan a kapszaicin deszenzibilizáció jelenségét már igen korán megfigyelték, nemzetközileg elfogadottá ez csak 1967-

ben vált (Jancsó et al. 1967). A jelentős gyógyszergyári erőfeszítések dacára a klinikai gyakorlatban még napjainkban is csak a magas koncentrációjú kapszaicint tartalmazó készítmények használatosak, melyek a fenti kapszaicin deszenzibilizáció jelenségét kihasználva hatékonyak különböző fájdalommal járó állapotokban (Wallace, Pappagallo 2011). A kapszaicin deszenzibilizáció nem feltétlenül a receptor funkció csökkenéséhez köthető, hanem a kapszaicin receptort expresszáló, regenerációra csak mérsékelten képes sejtek elhalása is fontos szerepet játszik a folyamatban (Jancso et al. 1977).

A következő mérföldkő a kapszaicin receptorra ható molekuláris struktúrák vizsgálata volt. Az első jelentős felismerés az 1975-76-ban Szolcsányi János és Jancsó-Gábor Aranka által publikált struktúra-aktivitás összefüggés vizsgálat volt, amely pontos megállapításokat tett a kapszaicin receptor ligandok szerkezetére (Szolcsányi, Jancso-Gabor 1975; Szolcsányi, Jancsó-Gábor 1976). Több, mint egy évtizeddel később történt a következő jelentős továbblépés ezen a területen, amikor a szintén magyar Szállási Árpád Peter M. Blumberg amerikai laboratóriumában felismerte, hogy a resiniferatoxin a kapszaicin receptor ultrapotens agonistája (Szallasi, Blumberg 1989), amelynek segítségével a kapszaicin receptoron lehetővé vált ligandkötődési kísérletek megfelelő érzékenységgű elvégzése (Szallasi, Blumberg 1990; Szallasi et al. 1991).

Az első valóban jól használható kompetitív antagonistá a capszazepin volt, amit a Sandoz munkatársai szintetizáltak 1992-ben (Bevan et al. 1992). Végül a kapszaicin receptor molekuláris azonosításának és a klónozott receptor szekvenciájának közlésére 1997-ben került sor (Caterina et al. 1997). A klónozott receptort hamar összefüggésbe hozták a hőérzettel és egyéb fájdalmas ingerekkel (Tominaga et al. 1998). Ezen megfigyeléseket a kapszaicin receptor hiányos egértörzs leírása is megerősítette (Caterina et al. 2000). Végül a kapszaicin receptort szerkezete alapján a tranziens receptor potenciál (TRP) csatornák közé sorolták és az ismert ligandjainak szerkezete alapján a vanilloid csoportjának első tagjaként (V1) nevezték el (TRPV1) (Gunthorpe et al. 2002).

1.3. A klónozott TRPV1

A klónozott TRPV1 hat transzmembrán szakaszt tartalmazó 838 aminosavból álló, 95 kD molekulatömegű fehérjének bizonyult (Caterina et al. 1997). A patkány TRPV1 92%-os hasonlóságot mutat a később klónozott humán receptor szerkezetével (McIntyre et al. 2001; Hayes et al. 2000). A csatorna működéséhez elengedhetetlen pórusformáló régió az 5-6. transzmembrán szakaszok között található (Caterina et al. 1997). A TRPV1 szerkezetében a hat transzmembrán régiót extracellulárisan összekötő hurok mellett fontos szerepet játszanak az N- és C-terminális hosszabb intracelluláris szakaszai is.

A TRPV1 struktúrájának ismeretében komoly erőfeszítéseket tettek annak érdekében, hogy a receptor funkcionálisan fontos régióit meghatározzák. Először a csatorna protonok általi szabályozásának, valamint a csatorna pórusformáló régióinak azonosítása történt meg (Jordt et al. 2000). Ennek során a csatornaformáló régiókat az 5-6. transzmembrán régióban azonosították, míg a protonok általi, a csatorna nyitását eredményező konformációváltozásban a két régiót összekötő huroknak tulajdonítottak jelentőséget. Ezt követte a ligandkötésben fontos aminosav oldalláncok azonosítása. A pórusformáló régiótól távolabb, a 3-4. transzmembrán régiókban és az ezeket összekötő hurokrégióban mutattak ki ligandkötésben szerepet játszó aminosav oldalláncokat (Jordt, Julius 2002). A kutatások során fény derült arra is, hogy a TRPV1-hez további molekulák is képesek kötődni, melyek szerepet játszhatnak a csatorna aktivitásának szabályozásában. Ezek közül behatóan tanulmányozták a kalcium-kalmodulin (CaM) (Numazaki et al. 2003), és a foszfatidil inozitol 4,5-biszfoszfát (PIP₂) kötődését (Prescott, Julius 2003).

A TRPV1 élettani szerepének vizsgálata során fény derült arra is, hogy a receptor aktivitása foszforilációval is szabályozódik. A receptor klónozását megelőzően kimutatták, hogy a receptor agonistákkal szembeni válaszkészsége csökken a kezelések során (*in vitro* deszenzibilizáció), mely folyamat mértéke jelentősen csökkenthető a protein foszfatáz 2B, (PPP2B, calcineurin) gátlásával (Docherty et al. 1996). Az is nyilvánvaló volt ugyanakkor, hogy ha a TRPV1 defoszforilációnak

jelentős szerepe van a receptor ligand-érzékenységének szabályozásában, akkor számottevő kináz aktivitásoknak is jelen kell lenniük, melyek az ellenkező irányú hatásokat mediálják foszforiláció által. Az első kináz, melyet összefüggésbe hoztak a TRPV1 kapszaicin kezelések során jelentkező deszenzibilizációjával a protein kináz A (PKA) volt (Lopshire et al 1998; Mohapatra et al 2003; Mohapatra et al 2005). Ezt követte a protein kináz C (PKC) szerepének felismerése (Premkumar et al 2000; Vellani et al. 2001), majd a kalcium kalmodulin függő protein kináz II (CaM kináz II) szerepének feltárása (Jung et al. 2004).

1.4. A TRPV1 élettani jelentősége

A TRPV1 stimulációja fájdalomhoz köthető, szenzoros neuronális hatásokat vált ki, melyet a kapszaicinnal végzett korai kísérletek is felvetettek (Hőgyes 1878). Későbbi kísérletekben már az is nyilvánvalóvá vált, hogy a kapszaicin az érző idegsejtekre hat (Jancsó et al. 1968; Jancsó et al. 1967), azonban a kapszaicin receptor léteire először Szolcsányi János és Jancsó-Gábor Aranka utalt 1975-ben (Szolcsányi, Aranka Jancso-Gabor 1975).

A TRPV1 élettani tulajdonságainak feltárása nagy lendületet vett a receptor klónozását követően (Caterina et al. 1997), amikor lehetővé vált a receptor tulajdonságainak részletes és szelektív vizsgálata. A klónozást követően a TRPV1-et szelektíven a hátsógyöki-, illetve trigeminális ganglionok kisméretű sejtjeiben azonosították (Caterina et al. 1997), közelebbről a szenzoros neuronokban, ott is elsősorban a C és A δ sejtekben (Tominaga et al. 1998). Ezt a képet tovább erősítették a receptor hiányos egérrel kapcsolatban kapott eredmények, amelyek a TRPV1 fájdalomérzetben és különösen a gyulladás mellett megjelenő hőérzékenység fokozásában betöltött élettani szerepére utaltak (Caterina et al. 2000). Mint később kiderült, a TRPV1 expressziója korántsem ilyen szelektív, amely ténynek komoly következményei lettek a fájdalomcsillapító terápia céljából kifejlesztett TRPV1 antagonisták klinikai alkalmazhatósága tekintetében.

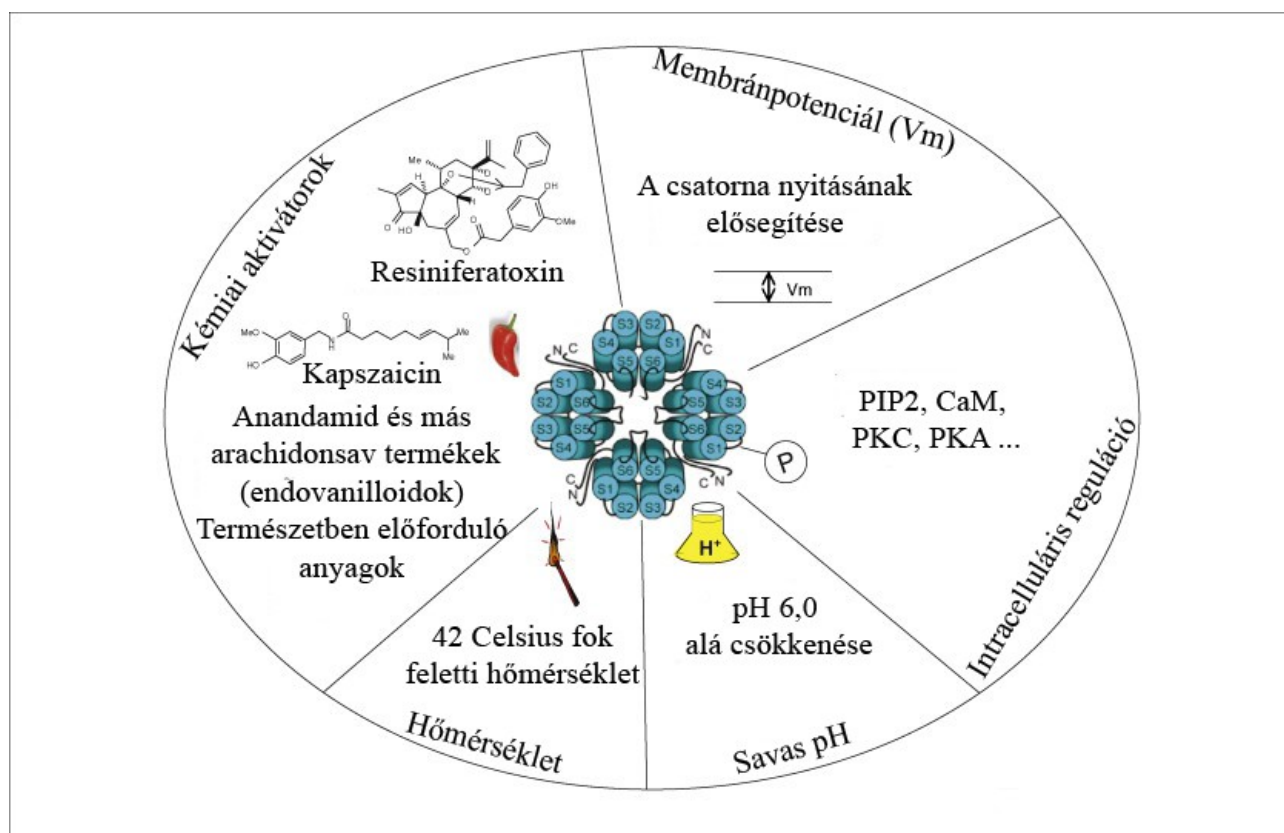
A kapszaicin szenzoros neurokra gyakorolt szelektív hatásait már a receptor klónozása előtt megfigyelték. Az első közlemény a Jancsó-Szolcsányi által korát messze megelőző két közlemény

volt, amelyeket egy évtizedig jórészt érdektelenség kísért (Jancsó et al. 1968; Jancsó et al. 1967). Ezekben a közleményekben leírásra került, hogy a kapszaicin hatására a szenzoros neurotranszmissziót gátló lidokain jelenlétében is megfigyelhető plazma extravazáció. Ezen jelenség magyarázatára az első közleményt Jessell és munkatársai közölték, akik felismerték, hogy a kapszaicin kezelés hatására a szenzoros neuronokból P-anyag kiáramlás történik (Jessell et al. 1978). Ezt az alapvető felismerést nem sokkal követte annak leírása, hogy a Jancsó és Szolcsányi által megfigyelt plazmaextravazációt a szenzoros neuronokból kiszabaduló P-anyag közvetítette, amely a plazmaextravazáció mellett antidrom vazodilatációt is kiváltott (Lembeck, Holzer 1979).

Elsősorban Szolcsányi munkásságának eredményeként mára elfogadottá vált az a nézet, hogy a kapszaicin érzékeny szenzoros neuronok hármas funkciót látnak el: az egyik a már fentebb említett nocicepció, amelynek során a TRPV1 aktiváció a szenzoros neuronokban tovaterjedő akciós potenciálok által közvetített módon fájdalomérzethez vezet. Ezen folyamatban az akciós potenciál tovahaladását gátló anyagok, mint a lidokain, a TRPV1 stimulációt követő fájdalomérzet kialakulását gátolni képesek (Szolcsányi et al. 1988). A második funkció a lokális efferens hatás. Ennek során a szenzoros neuronokba áramló Ca^{2+} közvetlenül képes a neuronális terminálisokban dokkolt neurotranszmittereket tartalmazó vezikulák kiürülését kiváltani. Ezen folyamatban az ingerület tovahaladását gátló anyagok, mint a lidokain hozzáadása hatástalan (Szolcsányi 1984b; Szolcsányi 1984a). A lokális neurotranszmitter felszabadulásnak eredménye egy lokális neurogén (steril) gyulladásnak megfelelő jelenség (Szolcsányi et al. 1988), amely számos, fájdalomérzettel társuló kórképben megfigyelhető. Végül, a TRPV1 stimulációt követően olyan szisztémás hatással rendelkező neuropeptidok is felszabadulhatnak, amelyek szisztémás efferens hatások kialakulásához is vezethetnek. Ezen potenciális neuropeptidok közül talán a szomatosztatin szerepét tárták fel leghamarabb (Szolcsányi et al. 1998; Szolcsányi et al. 1998).

A TRPV1 a sejt környezetében lévő potenciálisan fájdalmas fizikai és kémiai hatások integrátora (Szolcsányi, Sándor 2012). Ezen aktiválódási módok közül a ligandok, a hőmérséklet

emelkedése, intracelluláris jelátviteli rendszerekkel történő szabályozás, a pH csökkenése, valamint a membránpotenciál pozitív irányú megváltozása egyaránt fontos szerepet játszhat (1. ábra).



1. ábra: A TRPV1 stimuláció lehetséges módjai

Az ábrán a TRPV1 komplex regulációja látható. A receptort aktiválják ligandok (kémiai anyagok), a membránpotenciál változása, intracelluláris jelátviteli útvonalak, kapcsolódó fehérjék, a pH csökkenése, és hőmérséklet is. Az ábra (Martin J Gunthorpe, Chizh 2009) alapján (Figure 1) készült.

A TRPV1 vaszkuláris biológiai jelentősége némileg háttérbe szorult az új típusú, közvetlenül a nociszenzorra ható fájdalomcsillapító molekulák ígéretét magában hordozó szenzoros neuronális TRPV1 gátlás mögött. A TRPV1 mediált vaszkuláris hatások közül kiemelkedik a vazodilatatív hatás, amely elsősorban a szenzoros neuronális neurotranszmitterek felszabadulásához köthető (lokális efferens hatás). Ezzel a mechanizmussal összhangban leírták, hogy a TRPV1 stimulációja vazodilatációt vált ki mezenterialis, máj, baziláris, durális és meningeális artériákban (Zygmunt et al. 1999; Ralevic et al. 2001; Harris et al. 2002; Dux et al. 2003; Akerman et al. 2004; O'Sullivan et al. 2004). Ezzel szemben felmerült annak a lehetősége is, hogy a kapszaicin hatására felszabaduló P-anyag vazodilatációhoz vezethet (Scotland et al. 2004). Korábbi közleményekben pedig

kapszaicin nem-neuronális, közelebbről nem karakterizált mechanizmussal történő vazokonstriktív hatása is szóba került (Donnerer, Lembeck 1982; Cameron-Smith et al. 1990; Edvinsson et al. 1990; Escott et al. 1995; Canver et al. 1997; Robert Pórszász et al. 2002; Keeble et al 2006; Dux et al. 2003).

Összességében megállapítható, hogy a TRPV1 stimuláció hatására bekövetkező vaszkuláris változások között nagy faj- és szövet specifikus különbségek figyelhetők meg. Mindenesetre a tudományterületen uralkodó álláspont szerint a TRPV1 stimuláció hatására felszabaduló lokális neuropeptidek vazodilatációt váltanak ki.

1.5. A TRPV1 mint gyógyszercélpont

A TRPV1 magában hordozza azt az ígéretet, hogy gátlásával egy új típusú fájdalomcsillapító terápia valósítható meg, mely felhasználható lehet olyan gyógyszergyári szempontból optimálisnak tekinthető betegségekben, mint a neuropátiás fájdalom. A neuropátiás fájdalmat az teszi vonzóvá a gyógyszergyárak számára, hogy elég kellemetlen ahhoz, hogy az ebben szenvedő betegek gyógyszereiket felírassák, kiváltsák és beszedjék, továbbá évtizedekig is szükséges lehet a kezelés.

Az első megemlíthető vegyület mindenképpen a capsazepine (Bevan et al. 1992). A capsazepine ugyan nem került klinikai felhasználásra alacsony *in vivo* stabilitása és rossz farmakokinetikai tulajdonságai miatt (Walker et al. 2003), de mégis megalapozta a TRPV1 antagonistákkal kapcsolatos kutatásokat molekuláris farmakológiai értelemben. A capsazepinet sok további, klinikai vizsgálatokban is tesztelt vegyület követte: urea származékok: BCTC, A-425619, SB-705498 és az ABT-102; amidok: JTS-653 és PAC-14028; vanilloidokhoz struktúráisan nem hasonló: AMG-517-et és az MK-2295-öt (korábbi nevén NGD 8243).

A TRPV1 kutatásában a modalitás az utóbbi évek sikertémája, amit a TRPV1 antagonisták klinikai bevezetésének sikertelensége indokol. A jelenlegi elképzelés szerint a TRPV1 antagonisták modalitás-specifikus tervezésével a nem kívánt klinikai mellékhatások, így például a hipertermia is megelőzhető lehet (Garami et al. 2010).

2. Eredmények

2.1. A TRPV1-en ható, természetben előforduló ligandok azonosítása, jellemzése

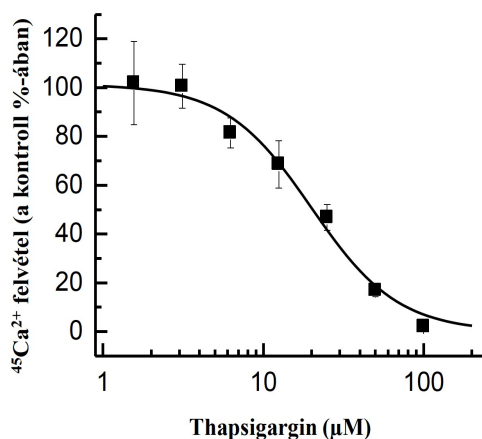
2.1.1. A thapsigargin mint egy természetben előforduló TRPV1 antagonist.

A TRPV1 expresszió CHO-TRPV1 sejtekben a sejtmembrán mellett a citoszolban is megfigyelhető, amely felveti annak lehetőségét, hogy a TRPV1 (a szenzoros neuronokkal ellentétben, ahol valószínűleg nincs endoplazmatikus membránrendszer) ebben a heterológ expressziós rendszerben intracelluláris membránokban is expresszálódik. Funkcionális TRPV1 jelenléte esetén azonban a sejt-permeábilis agonistákkal történő kezelés hatására ezen receptorok is aktiválódhatnak és ennek során az intracelluláris raktárakból kiáramló Ca^{2+} is hozzájárulhat az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció megemelkedéséhez. Ezen hipotézis tesztelése érdekében CHO-TRPV1 sejteket előkezeltünk a szarkoplazmás retikulum ATP-áz gátló thapsigarginnal, amely az intracelluláris Ca^{2+} raktárak kiürítése révén képes gátolni az esetleges intracelluláris komponensét a citoplazmatikus Ca^{2+} emelkedésének (Tóth et al. 2002). A kísérletekben intracelluláris Ca^{2+} imaging technikát használtuk CHO-TRPV1 sejteken. Az eredmények szerint a thapsigargin képes az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt megemelni CHO sejteken és TRPV1 transzfektált CHO sejteken (CHO-TRPV1) egyaránt. Az intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedése a thapsigargin adását követően nagyjából egy perc múlva kezdődik, maximumát mintegy 2 perccel később éri el. A félmaximális intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedés kiváltásához szükséges thapsigargin koncentráció az ismételt kísérletekben 44 nM-nak adódott. Ezen eredményeink összhangban voltak a thapsigargin SERCA gátló hatásával.

CHO-TRPV1 sejteken vizsgáltuk a TRPV1 stimulációjának hatását thapsigarginnal történő

előkezelés után. A kísérlet során az intracelluláris Ca^{2+} raktárak kiürítéséhez szüségtelenül nagy koncentrációjú thapsigargin kezelést alkalmaztunk, és azt tapasztaltuk, hogy a thapsigargin jelenlétében a kapszaicin hatására nem következett be intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedés. Ez a jelenség azonban nem volt magyarázható az intracelluláris Ca^{2+} raktárak kiürülésével, mert a thapsigargin a kapszaicin hatását *steady state* körülmények között is gátolta. Ez arra utalt, hogy a thapsigargin közvetlenül is gátolhatja a TRPV1-et.

Ennek ellenőrzésére a plazmamembránon keresztüli, TRPV1 mediált Ca^{2+} felvételt mértük 2. ábra. Eredményeink szerint a thapsigargin gátolta a kapszaicin mediált $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvételt, a félmaximális gátláshoz szükséges koncentráció $6,4 \pm 1,9 \mu\text{M}$ volt.

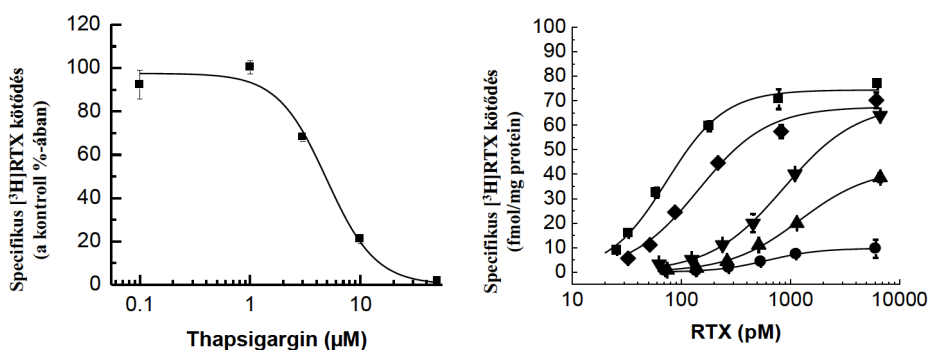


2. ábra: Thapsigargin gátolja a TRPV1-et

CHO-TRPV1 sejteket 15 percig az ábra x-tengelyén feltüntetett thapsigargin koncentrációk mellett inkubáltuk, majd a $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvételt 50 nM kapszaicin hozzáadásával indukáltuk. Az 5 perces inkubációt követően a felülúszót elmostuk és a sejtekben felhalmozódott $^{45}\text{Ca}^{2+}$ szcintillációs számlálással mutattuk ki. Az ábrán mért $^{45}\text{Ca}^{2+}$ aktivitás értékeket a thapsigargin hiányában kapott értékekhez viszonyítottuk. Minden koncentrációt 4 párhuzamosban mértük. Az ábrán egy jellemző kísérlet eredménye látható (Tóth et al. 2002).

Annak eldöntésére, hogy a thapsigargin a kapszaicin kötőhelyen fejti-e ki a gátló hatását ligandkötődési kísérleteket végeztünk [^3H]RTX felhasználásával. A [^3H]RTX kötődését különböző thapsigargin koncentrációk mellett követtük CHO-TRPV1 sejtek membrán preparátumain (3. ábra). Eredményeink szerint a thapsigargin képes volt a [^3H]RTX kötődését gátolni, ennek alapján a TRPV1-thapsigargin komplex stabilitási állandója $4,0 \pm 1,3 \mu\text{M}$. A thapsigargin-kapszaicin kötőhely viszonyát részletesebben vizsgálva fény derült arra is, hogy a [^3H]RTX kötődését a thapsigargin

vegyes mechanizmussal gátolja, amelyben a közvetlen kompetíción túl a receptor konformációjára gyakorolt hatásnak is szerepe lehet.



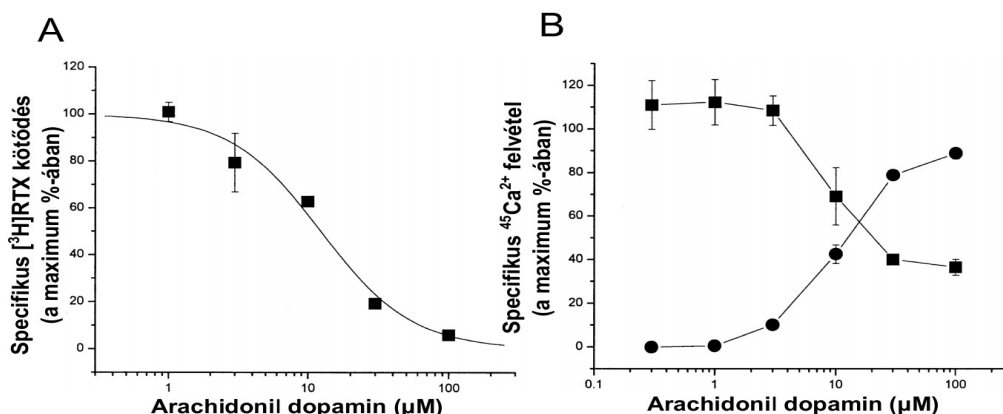
3. ábra: A thapsigargin a TRPV1 kapszaicin kötőhelyéhez is kötődik

A thapsigargin 50-100 pM triciált resiniferatoxin ([³H]RTX) jelenlétében inkubáltuk CHO-TRPV1 sejtek membrán preparátumaival. A [³H]RTX kötődését szcintillációs számlálóval határoztuk meg a pelletben (az elegy centrifugálását követően) és a felülúszóban. Az ábrán a specifikus kötődést a thapsigargin hiányában végzett kísérletek %-ában mutatjuk. A [³H]RTX kötődést teljes tartományban állandó koncentrációjú thapsigargin (0; 2,5; 5; 10; 20 μM) mellett is meghatároztuk (jobb oldali ábra) (Tóth et al. 2002).

2.1.2. N-arachidonil dopamin (NADA), mint TRPV1 ligand

Az N-arachidonil dopamin esetében korábban leírták, hogy képes a TRPV1-hez kötődni és annak aktivitását a nanomoláris tartományban gátolni (Huang et al. 2002). Kísérleteinkben mindenekelőtt ellenőriztük a korábban publikált adatokat. Eredményeink szerint a NADA képes a [³H]RTX kötődését gátolni CHO-TRPV1 sejtek membránjában expresszáldó receptorokhoz (4. ábra, A panel). A NADA stabilitási állandója $5,49 \pm 0,68$ μM-nak adódott ebben a rendszerben (CHO-TRPV1), amely érték nem állt távol az endogénen expresszáldó TRPV1 esetében kapott $9,7 \pm 3,3$ μM-tól. A NADA TRPV1-re gyakorolt funkcionális hatásait ⁴⁵Ca²⁺ felvétel segítségével vizsgáltuk exogén TRPV1-en (4. ábra, B panel). A NADA hatékonysága a patkány TRPV1-en $4,76 \pm 1,43$ μM-nak, míg a humán TRPV1-en $7,17 \pm 1,64$ μM-nak adódott (az ábrán a patkány receptorral kapott adatok láthatóak). A NADA viszonylag alacsony hatáserőssége miatt felvetődött, hogy élettani körülmények között esetleg nem is agonistaként, hanem antagonistaként viselkedik. A NADA hatékonyságát ezt követően számos *in vitro* helyzetben vizsgáltuk intracelluláris Ca²⁺ koncentráció mérésével a CHO sejtekben expresszáltatott patkány TRPV1-et felhasználva. Összességében a

kapszaicin és a NADA esetében rendkívül hasonló viselkedést láttunk az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változásokat tekintve, attól a tényről eltekintve, hogy a NADA koncentrációja ezen kísérletek során három nagyságrenddel haladta meg a kapszaicinét.



4. ábra: Az N-arachidonil dopamin kötődik a TRPV1-hez és befolyásolja annak aktivitását

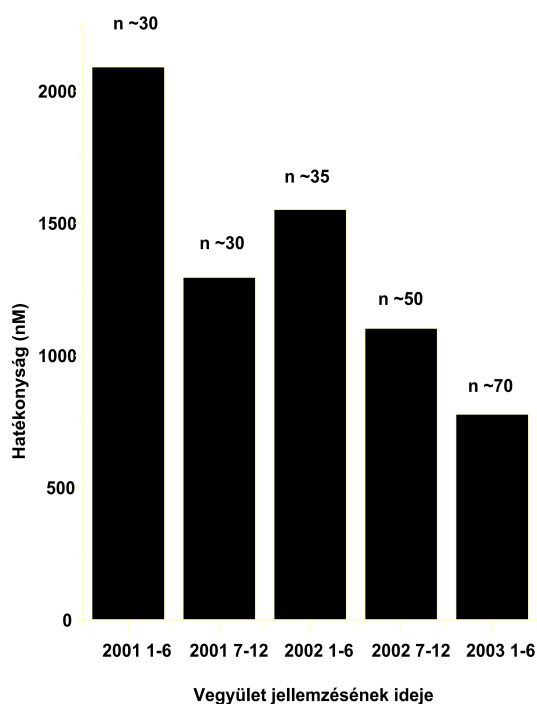
Az N-arachidonil-dopamin hatásait CHO-TRPV1 sejtekben határoztuk meg. A $[^3\text{H}]\text{RTX}$ kötődési kísérletekben az x-tengelyen feltüntetett arachidonil-dopamin koncentrációk mellett 50-100 pM $[^3\text{H}]\text{RTX}$ kötődését vizsgáltuk CHO-TRPV1 sejtek membránjához. A kapott adatokat az arachidonil dopamint nem tartalmazó reakciókban mért értékek százalékában fejeztük ki. A funkcionális kísérletekben az arachidonil dopamin hatását agonista és antagonist mérési körülmények között is vizsgáltuk. Első esetben az arachidonil dopamint a $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -mal együtt adtuk a sejtekhez és az 5 perc alatt felvett radioaktív izotóp mennyiségét határoztuk meg (teli körökkel jelölve). Az adatokat a 300 nM kapszaicin által kiváltott hatásokhoz hasonlítottuk. Az antagonist hatás méréséhez a sejteket 15 percig inkubáltuk arachidonil dopaminnal, majd ekkor adtuk az elegyhez a $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -ot és 50 nM kapszaicint. A kapott adatokat a kapszaicin esetében mért értékekhez hasonlítottuk (kitöltött négyzetek) (Tóth et al. 2003).

2.2. A TRPV1 molekuláris farmakológiája

A TRPV1-en ható molekulák fejlesztésébe Peter M. Blumberg laboratóriumában kapcsolódtam be, ahol Jeewoo Lee szöuli intézetével együttműködésben dolgoztunk. A molekulákat Szöül-ban (Dél-Korea) szintetizálták, mi pedig teszteltük hatásaikat a receptor funkcióra ($^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvétel) és a receptor-ligand komplex stabilitására ($[^3\text{H}]\text{RTX}$ kompetitív kötődés). A 2001-2003 között végzett *in vitro* tesztekben több, mint 200 molekulát vizsgáltunk és a kísérletek mintegy felét végeztem én (ez mintegy félmillió egyedi kísérletes adatot jelentett esetemben). A két év alatt a tesztelt molekulák hatékonysága (az összes molekula átlagában) a nanomólos tartományba került (5. ábra). Mi több, a periódus végére a leghatékonyabb vegyületek hatékonysága már a pikomólos tartományba esett.

2.2.1. Parciális agonisták

Peter M. Blumberg laboratóriumában legelső feladatomban a JYL-1511-es kódszámú molekula tesztelése volt. A molekula a capsazepineben felismert tiourea „B” régiót tartalmazta. Az „A” régió fenil csoportjához az akkoriban rendkívül sikeresnek mondható, és a laboratóriumban vezérstruktúrának használt metánszulfonamid csoport került beépítésre. A molekulák fejlesztése során kettős célt kívántunk megvalósítani. Egyrészt az „A” régióban a fenil csoporton történő további szubsztitúciók hatását teszteltük, másrészt a resiniferatoxinban található rendkívül komplex „C” régiót próbáltuk egyszerűbb struktúrákkal helyettesíteni.



5. ábra: Peter M. Blumberg laboratóriumában, közreműködésemmel végzett molekulafejlesztés

Az oszlopok tetején látható, hogy az adott időszakban hány vegyületet kaptunk Jeewoo Lee koreai laboratóriumából. Az y tengelyen látható az adott időszakban (x-tengelyen év hónaptól-hónapig) kapott vegyületek átlagos *in vitro* hatékonysága. A meghatározások mintegy felét végeztem én ebben a periódusban.

A JYL-1511 tesztelése komoly kihívást jelentett. Sehogyan sem sikerült az addig megszokott típusú eredményeket kapnom: amikor a vegyülettel 50 nM kapszaicin hatását próbáltam gátolni, akkor nem sikerült teljes gátlást elérni ($84,1 \pm 3,2\%$ antagonizmus), míg amikor a vegyület hatását önmagában a TRPV1-re vizsgáltam, akkor mindig volt némi aktiváció a $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvétel

tanulása szerint ($17,4 \pm 0,6\%$ agonizmus). Az adatok és a kísérlet részletes elemzését követően meggyőződünk róla, hogy az eredmények helytállóak és így a JYL-1511-et azonosítottuk először, mint a TRPV1-en ható parciális agonistát. Nem sokkal később, már célzott vizsgálataink eredményeként a JYL-827 esetében is hasonló tulajdonságokat találtunk. Mindkét vegyület képes volt a [^3H]RTX kötődését alacsony koncentrációban gátolni (JYL-1511: $50,4 \pm 16,5$ nM, JYL-827: $29,3 \pm 7,6$ nM).

A parciális agonista hatást ezt követően a receptor környezetében található különböző modalitások változtatása mellett is meghatároztuk. A receptor expresszió növelésének hatására a vegyületek agonizmusa a funkcionális kísérletekben nőtt. Vizsgáltuk a hőmérséklet, pH és PKC aktiváció hatását a receptor aktiválhatóságára a JYL-1511 és a JYL-827 esetében. Azt találtuk, hogy az érzékenyítő stimulusokra mindkét vegyület esetében fokozódik az agonizmus mértéke.

2.2.2. TRPV1 antagonisták: vezérmolekulák és modalitás a hatékonyságban

A TRPV1 kutatásában az antagonistáknak mindig nagyobb szerepe volt, mint az agonistáknak. Nem volt ez másként esetünkben sem. Az erőfeszítéseink során vezérstruktúrának a capsazepine szerkezetét használtuk, melyet mind az „A” régióban, mind a „C” régióban optimalizálni igyekeztünk. Az „A” régióban a benzolgyűrűhöz a vanilloidokban megtalálható fenolos hidroxilcsoport helyettesítésére metánszulfonamid csoportot alkalmaztunk, továbbá a „C” régióban a capsazepine kloro-fenil csoportja helyett tercier-butil-fenil csoportot építettünk be. Mindemellett a JYL-1421 esetében a vanilloidokban található hidroxil-metil csoport helyett egy halogén (fluor) beépítése is megtörtént.

A vegyületekkel kapott eredményeink rendkívül kedvezőek voltak. A JYL-1421 $53,5 \pm 6,5$ nM-os hatékonysággal kötődött a TRPV1-hez, és a funkcionális kísérletekben $9,2 \pm 1,6$ nM-os hatékonysággal gátolta a TRPV1-en keresztüli $^{45}\text{Ca}^{2+}$ beáramlást. A JYL-1421 és a KJM-429 farmakológiai tulajdonságait részletesen vizsgáltuk. Mindkét vegyület kompetitív módon gátolta a kapszaicin és reziniferatoxin funkcionális hatásait CHO-TRPV1 sejteken.

dc_652_12

Az alapvető farmakológiai tulajdonságok meghatározását követően a vegyületek részletes analízisével folytattuk munkánkat. A vegyületek hatékonyságát megvizsgáltuk magasabb hőmérsékleten, alacsonyabb pH-n és PKC aktiváció mellett is. Az eredmények szerint a JYL-1421 minden körülményben jelentős antagonistá hatással bírt, ám a KJM-429 az érzékenyített TRPV1-en parciális agonista hatásokat mutatott.

Az optimális vezérmolekula kialakítása érdekében a capsazepine tiourea „B” régiója mellett a molekula „A” és „C” régiójában is történtek módosítások. Ezen módosítások célja az „A” régióban a metánszulfonamid csoport előnyeinek kihasználása, továbbá a „C” régióban a resiniferatoxin rendkívüli hatékonyságának egyszerűbb molekuláris struktúrákkal történő megőrzése volt. A templáthoz a strukturális alapot a JYL-827 esetében megfigyelt magas hatékonyság adta.

A különböző molekuláris struktúrák vizsgálata során a vezérmolekulához képest sikerült előrelépést tenni az antagonistá hatékonyságában. Az előrelépést a JYL-1421 vegyület esetében bemutatott „A” régiónak a létrehozása jelentette, melyet a JYL-827-ben bevezetett „C” régióval kombináltunk. Az így nyert **61**-es számú vegyület hatékonysága a [³H]RTX kompetíció alapján 54±28 nM volt, míg a kapszaicin kiváltott TRPV1 mediált ⁴⁵Ca²⁺ felvételt 7,8±3,0 nM-os Ki értékkel gátolta. A JYL-827 és **61**-es számú vegyület fájdalomcsillapító hatása az ecetsav által kiváltott fájdalom (writhing) modellben elérte a kontroll analgetikumként használt ketorolac hatékonyságát *in vivo* (Lee et al. 2003).

2.3.3. Molekulafejlesztés

Erőfeszítést tettünk az „A” régió optimalizálására. Ennek szükségességét két tény adta. Az egyik az, hogy a molekulák TRPV1-en mutatott hatékonysága ezen régióban bekövetkező módosításokkal volt leginkább modulálható de ennek ellenére viszonylag kevés olyan struktúrát ismertünk, amelyek mellett a vegyületeknek számottevő aktivitása volt. A másik ok a vanilloidok

ezen régiójában elhelyezkedő fenolos hidroxilcsoport *in vivo* metabolizmusban való érzékenysége.

A kapott adatok szerint a metánszulfonamid csoport jelenlétében az „A” régióban a fenolos hidroxil csoport elhagyható. További fontos megfigyelésünk volt, hogy a tiourea „B” régió melletti szénatomon történő szubsztitúciók hatása térszerkezet specifikus (Chung et al. 2007). Az R konfigurációban beépített metil csoport mellett a molekula jelentős hatékonysággal rendelkezett, míg az S konfigurációban beépített metil csoport esetében a molekula képtelen volt kötődésre és nagyon alacsony antagonistá hatással rendelkezett.

Egy tanulmányban részletesen elemeztük az „A” régióban a metánszulfonamid csoportok mellett más szubsztitúciók jelentőségét (Lee et al. 2005). Eredményeink szerint a vanilloidokban 2-es pozícióban lévő hidroximetil csoport lecserélhető H, vagy F atomokra, amely szubsztitúció javítja az antagonistá hatást. Mindemellett az is világossá vált, hogy a benzol gyűrű 1-es pozíciójában elvégzett szubsztitúciók kevésbé érintik a molekulák hatékonyságát.

Az „A” régió szerkezetének összefüggéseit vizsgáltuk a „B” és „C” régiókban található királis szénatomokhoz sztereospecifikusan kapcsolt ligandokkal. Ez esetben egy teljesen új „B” régió került beépítésre: az amid kapcsoló régió a kapszaicinhez képest fordított helyzetben van. Az új vegyületekben egyébiránt a JYL-827-ben és a hasonló struktúrákban sikeresen azonosított szerkezeteket használtuk fel (Ryu et al. 2008) az „A” és „C” régióban. Tovább lépést jelentett ugyanakkor, hogy ez esetben két kiralitáscentrumon a sztereospecifikus szintézis miatt a csoportok térbeli helyzetének hatásait is tudtuk vizsgálni. Eredményeink szerint a „B” régió módosítása pozitívan érintette a molekulák farmakológiai tulajdonságait a tiourea templáthoz képest a racém vegyületeket tekintve. A sztereokémiai optimalizálás eredményeképpen a racém elegy inaktív komponensének eliminálásával sikerült további kétszeres növekedést elérni az hatékonyságban. Mi több, az „A” régióban a klorid fluoriddal történő helyettesítése képes volt ezen sztereospecifikus ligand hatékonyságát tovább növelni. Az optimalizálás eredménye egy pikomoláris tartományban aktív, az amid csoporton kívül más nyilvánvalóan metabolikusan érzékeny régiót nem tartalmazó,

viszonylag egyszerű szerkezetű TRPV1 antagonistá lett.

Egy kísérletsorozatban próbálkoztunk azzal is, hogy az „A” régió és a „B” régió egymáshoz viszonyított helyzetét a capsazepineben láthatóhoz hasonló módon rögzítsük (Lim et al. 2009). A térszerkezet rögzítése azonban az alkalmazott ligandokkal nem volt sikeres, valamennyi esetben jelentősen rosszabb tulajdonságokkal rendelkező vegyülethez jutottunk, mint a kiindulási vezérmolekulák voltak.

A resiniferatoxin hatékonysága a TRPV1-hez nagyjából 1000-szer nagyobb, mint a kapszaiciné. Ezen nagyobb hatékonyság strukturális alapjának feltárására a resiniferatoxin „C” régiójának felhasználásával vizsgáltuk a különböző „A” régiók hatékonyságát (Choi et al. 2009). A kapott vegyületeket tesztelve sok, rendkívül hatékony molekulát sikerült azonosítani. A leghatékonyabb vegyület (1-es számú vegyület) hatékonysága a funkcionális mérésekben meghaladta a resiniferatoxin hatékonyságát is.

A KJM-429 sikere alapján erőfeszítések történtek arra, hogy a „C” régió módosításával növeljük a molekulák hatékonyságát. Ennek egyik eleme a „B” régió és a „C” régió benzolgyűrűje közötti szakasz optimális hosszának meghatározása volt. A „B” régió és a tercier butil-fenil csoport közötti távolság egyetlen szénatommal történő megnyújtása jelentősen csökkentette a molekula hatékonyságát a TRPV1-hez. A templáton alapuló további módosításokkal sem sikerült a vegyületek hatékonyságát javítani. Ugyanakkor a módosítások során egy eddig még nem tesztelt 1-metil-2,3-dihidro-indán csoport hasonlóan sikeresnek bizonyult, mint a szerkezetekben általunk gyakran használt tercier-butil-fenil csoport (Lee et al. 2004).

A tiourea templát felhasználásával vizsgáltuk az „A” és a „B” régióban az aromás csoportok „B” régiótól való optimális távolságát. A kapott eredmények szerint az aromás csoportok távolsága erősen kötött a molekulákban. Egy-egy szénatom távolsággal megnyújtva a molekulák TRPV1 iránti hatékonysága jelentősen csökkent (Lee et al. 2004). Mindemellett az a meglepő eredmény is született, hogy a TRPV1-ligand stabilitás nem feltétlenül függ össze a molekula csatorna funkciót

gátló hatásával. Így például a vezérmolekulával szemben a dimetil-benzol csoport távolságának egyetlen szénatommal történő növelése a kötődés alapú hatékonyságban 50-szeres csökkenéshez vezetett, míg a funkcionális kísérletekben ez a hatás csak 2-szeres volt (JYL-827 és 11-es számú vegyület).

A „C” régió belüli optimális távolság kialakításánál figyeltünk fel arra a tényre (Lee et al. 2004), hogy a tercier-butil-fenil származékok esetében ezen csoport távolsága a molekula vázát jelentő tiourea, illetve amid csoporttól kevésbé befolyásolta a molekula hatékonyságát az „A” régióban homovanillil csoportot tartalmazó agonisták esetében.

A „B” régiót gyakran a szintetikus vegyész életét megkönnyítő, két reakcióképes funkciós csoport összekapcsolódásának helyeként tekintjük. A „B” régió ennek ellenére nagy szerepe lehet a TRPV1-en való hatékonyság meghatározásában. Bizonyos értelemben a „B” régió mellett található szénláncok optimális hosszának vizsgálata is ezt a kérdést feszegette. Egy független tanulmányban ennek kiegészítéseként arra kerestük a választ, hogy az általánosan elterjedt kapcsoló régiók kiegészítése új funkciós csoportokkal, továbbá az atomok sorrendjének és relatív pozíciójának átrendezése milyen hatással van a vegyületek TRPV1-en kifejtett aktivitására. Eredményeink szerint a „B” régióban található módosítások minden esetben előnytelen konformációváltozáshoz vezettek, és az atomok sorrendjének megcserélésével sem tudtunk a hatékonyságban növekedést elérni (Lee et al. 2005).

A „B” régió optimalizálásánál továbbá újabb templátokat is vizsgáltunk, amelyek segítségével további információkat nyertünk az optimális ligandok térszerkezetéről és a kívánatos elektron eloszlásról. Az adatok szerint a vizsgált „A” és „C” régiók mellett az újabb csoportok beépítésével nem sikerült a TRPV1 iránti hatékonyságot növelni, jóllehet a hidrox-tiourea csoport esetében az hatékonyság csökkenés az *in vitro* kísérletekben nem volt drámai, és az *in vivo* aktivitás ebben az esetben még meg is haladta a vezérmolekula hatékonyságát. Ezen utóbbi eredményeink tükrében úgy tűnik, hogy a „B” régióban található módosítások is szerepet játszhatnak a vegyületek

biológiai hatásának meghatározásában (Lee et al. 2004).

A „B” és „C” régiókban további struktúrákat is teszteltünk. A kísérletek egyik célja a „B” régióban kettős kötésekkel modulált atomtávolságok alapján közelebbi adatokat nyerni az optimális távolságokról ezúttal az amid templát felhasználásával. Figyelemreméltó volt, hogy a propánamid régió esetében a hatékonyság megtartott maradt.

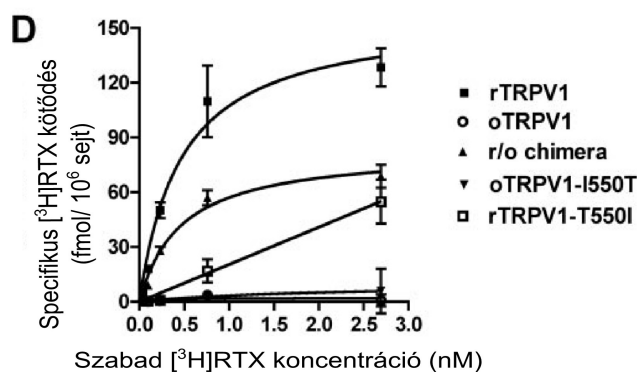
Ezt követően a terc-butil-fenil csoport optimális távolságát határoztuk meg a propánamid csoporttól. Meglepő eredményre jutottunk, amennyiben az összekötő szakaszt egyetlen szénatommal meghosszabbítva a korábbiaknak megfelelően egyértelműen kisebb hatékonyságot kaptunk, azonban a lánc további hosszabbítása és kettős kötés bevitele után a kapott molekula hatékonysága megközelítette a vezérmolekuláét (Sun et al. 2012).

2.3. A TRPV1 ligandkötő helyének pozíciója

A TRPV1 ligandkötő helyének jellemzése érdekében egy kollaboratív erőfeszítés eredményeképpen a kapszaicin válasszal rendelkező patkány TRPV1-et a kapszaicinre érzéketlen nyúl TRPV1-gyel hasonlítottuk össze (Gavva et al. 2004). A feltételezett ligandkötő hely környékén található eltérő aminosavakat mutagenézissel módosítottuk, hogy a nyúl receptor vanilloid kötését helyreállítsuk (funkciónyeréses mutánsok előállítás). A teljes munkában az én feladatom [³H]RTX kötődési kísérletek végzésében merült ki, így csak ezen kísérletek eredményeit említem.

A kísérletekben tehát a nyúl TRPV1-ben található, a patkány TRPV1-hez képest eltérő aminosavakat irányított mutagenézissel a patkányéhoz hasonlóvá tették. A különböző mutánsok vanilloid kötését vizsgálva azonosítottuk a vanilloid kötésben fontos szerepet játszó aminosavakat. Először a vanilloid kötésben fontos régió került azonosításra. Ennek során az 505-550 aminosavak közötti régiót a patkány TRPV1 és a nyúl TRPV1 között kicserélték és egy kimérát állítottak elő. Ezt követően az adott régióban megfigyelhető eltérések szisztematikus mutagenézise következett. A mutáns fehérjéket emlős sejtekben expresszálták és a [³H]RTX kötést mértük. Az adatok szerint a [³H]RTX kötésre képtelen nyúl TRPV1 a patkány TRPV1 505-550 aminosavak közötti részének

birtokában képessé vált a vanilloid kötésre. Az 505-550 régióban számos eltérő aminosav volt a két faj TRPV1 szekvenciájában. Ezek közül először az 550-es aminosav cseréjére került sor. Az 550-es izoleucin treoninra cserélése a nyúl TRPV1 vanilloid érzékenységet nem javította, azonban a patkányban a fordított irányú csere jelentősen csökkentette a [3 H]RTX kötő képességet (6. ábra).



6. ábra: Nyúl-patkány TRPV kimérák vanilloid kötése

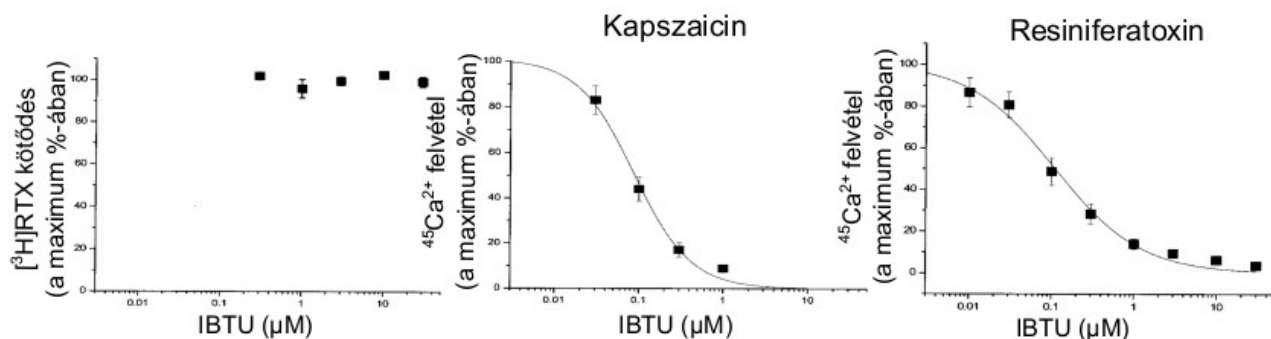
(Gavva et al. 2004) alapján.

A következő mutált aminosav az 547-es volt, amely nyúlban lizin, patkányban metionin. Ezek cseréje az 550. aminosav cseréjéhez hasonló eredménnyel járt: a patkány metionin aminosava a nyúl TRPV1-et nem tudta vanilloid kötésre képessé tenni, de a patkány TRPV1 vanilloid kötését jelentősen rontotta a lizinre történő mutáció. Akkor azonban, amikor mindkét fentebb említett aminosavat mutálták, a nyúl TRPV1 képessé vált a vanilloidok kötésére.

2.4. Modalitások a TRPV1 kapszaicin kötő helyén

Az IBTU (Tóth et al. 2004) egy kapszaicinnal homológ vegyületként érkezett tesztelésre. Meglepő tulajdonsága volt, hogy viszonylag nagy hatékonysággal volt képes a kapszaicin kiváltott $^{45}\text{Ca}^{2+}$ beáramlást csökkenteni CHO-TRPV1 sejteken, de nem volt képes a [3 H]RTX kötődését gátolni a receptorhoz. Fontos további megfigyelés volt, hogy habár a [3 H]RTX leszorítására a

kötődési kísérletekben nem képes, addig a funkcionális kísérletekben képes volt nem csak a kapszaicin által kiváltott receptor aktivációt gátolni, hanem az RTX által kiváltott hatásokat is.



7. ábra: Az IBTU hatékonysága a TRPV1-en: kötődés és funkcionális hatások

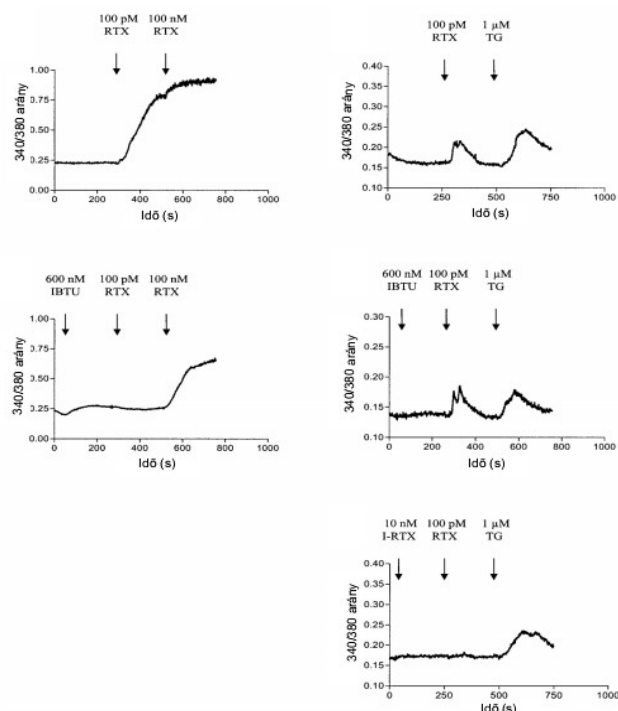
Az IBTU hatásait CHO-TRPV1 sejteken vizsgáltuk. A vegyület először nem tűnt perspektívusnak, mert a [³H]RTX kötődési kísérletekben nem volt képes a radioaktívan jelölt molekulát leszorítani (bal oldali grafikon). Ezzel szemben meglepő módon a funkcionális kísérletekben nem csak a kapszaicin (középső grafikon), hanem a resiniferatoxin (jobb oldali grafikon) ⁴⁵Ca²⁺ felvételt kiváltó hatását is képes volt gátolni. Az IBTU hatását az 50 nM kapszaicin által kiváltott ⁴⁵Ca²⁺ felvétel csökkenésként definiáltuk és százalékban fejeztük ki (Tóth et al. 2004).

Ezt a látszólagos ellentmondást részletesen vizsgáltuk. Eredményeink szerint nincs nagy különbség a különböző agonistákra gyakorolt gátló hatásban a sejtfelszíni receptoron. A sejtek válaszainak alaposabb megismerése érdekében intracelluláris Ca²⁺ koncentráció mérést is végeztünk. Eredményeink szerint az IBTU minden sejt kapszaicin válaszát képes volt gátolni, és hatékonysága megegyezett a ⁴⁵Ca²⁺ felvétellel meghatározott értékkel.

Az IBTU hatásait a sejten belüli (intracelluláris) TRPV1-re is vizsgáltuk. Ennek során azt találtuk, hogy habár CHO-TRPV1 sejtekben létezik egy intracelluláris Ca²⁺ raktár, amelyből a thapsigargin és az RTX is képes a Ca²⁺-ot felszabadítani, az itt elhelyezkedő receptor populációt az IBTU nem tudta gátolni (8. ábra).

Egy másik tanulmányban azt a kérdést vizsgáltuk részletesen, hogy az individuális vegyületek közötti hatás-kinetikai különbségek milyen molekuláris mechanizmusra vezethetőek vissza (Tóth et al. 2005). Ehhez az addig azonosított, akkorra publikált szerkezetű vegyületeket használtuk fel. A vegyületek hatékonyságát először a szokványos farmakológiai értékeknek megfelelően jellemeztük: hatáserősség és hatékonyság került meghatározásra. Az adatok alapján

nem találtunk nagy eltérést a korábban $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvétellel meghatározott értékekhez képest.

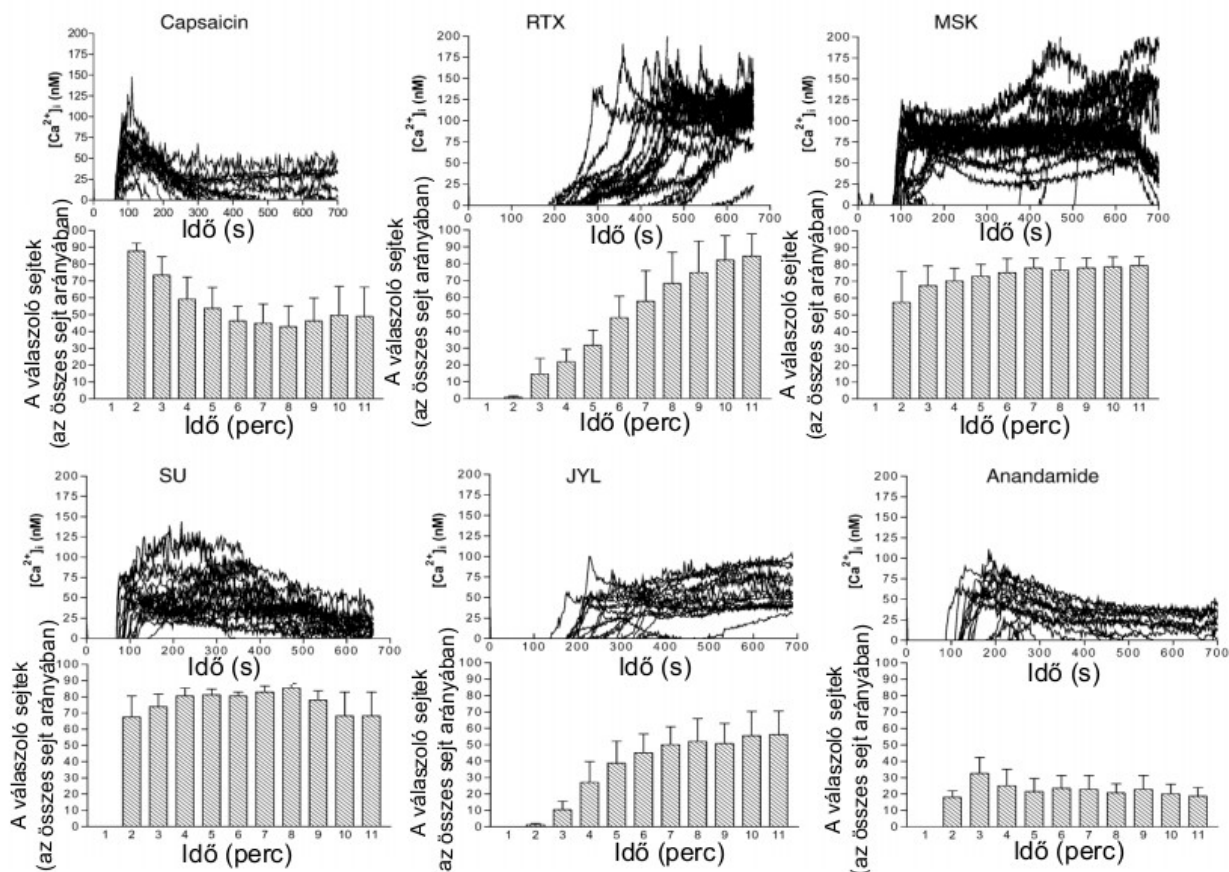


8. ábra: Az IBTU hatása az intracelluláris TRPV1-re

Az IBTU hatásait az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációra CHO-TRPV1 sejtekben határoztuk meg. A bal oldali grafikonok esetében a kísérleteket 1,8 mM míg a jobb oldali grafikonok esetében 0 mM Ca^{2+} volt az extracelluláris oldatban. A bal felső ábra tanulsága szerint a resiniferatoxin (RTX) az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedését váltja ki már igen alacsony koncentrációban (100 pM). A bal oldali alsó ábra tanulsága szerint ezt a hatását az IBTU képes volt gátolni, azonban ez a gátlás nagy koncentrációjú (100 nM) resiniferatoxinnal áttörhető volt (kompetitív jellegű gátlás). Kísérletet tettünk az intracelluláris raktárakból TRPV1 mediált módon történő Ca^{2+} felszabadulásra kifejtett hatások vizsgálatára. A resiniferatoxin alacsony koncentrációban képes volt Ca^{2+} felszabadításra az intracelluláris Ca^{2+} raktárakból (0 mM extracelluláris Ca^{2+} mellett, jobb felső grafikon). IBTU előkezelés nem befolyásolta a resiniferatoxin intracelluláris TRPV1-re kifejtett hatásait (jobb oldal, középső ábra), azonban egy resiniferatoxin analóg, az I-RTX azt érdemben gátolta anélkül, hogy az alacsony koncentrációjú thapsigarginnal kiváltható választ érdemben befolyásolta volna (Tóth et al. 2004).

Az individuális sejtek válaszkészségét vizsgálva ugyanakkor feltűnt, hogy a sejtek válasza a kezelések során eltérő volt. Alapvetően kétféle mintázatot figyeltünk meg, melyek a kapszaicinre és a resiniferatoxinra voltak jellemzőek. A kapszaicin esetében a sejtek uniform módon, a kapszaicin hozzáadását követően hamar válaszoltak, majd egy viszonylag rövid idő múlva a kapszaicin jelenlétében deszenzibilizálódtak, tehát a sejtek intracelluláris Ca^{2+} koncentrációja csökkent, majd egy alacsonyabb szinten stabilizálódott. Ezzel szemben a resiniferatoxin esetében a sejtek időben nagy szórással válaszoltak az anyag hozzáadását követően, azonban a válaszoló sejtekben az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció megtartott maradt, deszenzibilizációnak nem volt jele. Az SU-200

és MSK-195 jelű molekulák inkább kapszaicin-szerű választ adtak, míg a JYL-79 és az anandamid inkább a resiniferatoxinra jellemző viselkedést mutatott (9. ábra).



9. ábra: Individuális CHO-TRPV1 sejtek válasza agonista stimulusokra

Az egy látótérben látható összes CHO-TRPV1 sejt esetében rögzített intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változásokat tüntettük fel az ábrán (x-y diagramok). Az oszlopdiagramokon az adott időpillanatban (lásd x-tengely) a maximális válasz legalább 10%-ával rendelkező sejtek százalékos aránya látható (Tóth et al. 2005).

A kísérletek során az akut deszenzibilizáció (az agonista jelenlétében látható válaszcsökkenés) jelenségére is fény derült. Ennek nyomán követésére is értékeltük adatainkat. Az adatok szerint a resiniferatoxin, MSK-195 és a JYL-79 esetében viszonylag kismértékű deszenzibilizációt kaptunk, a sejtek válaszkészségében a csökkenés nem volt jellemző. A resiniferatoxin esetében az értékelésre használt körülmények között a 10. percig a sejtek mintegy fele válaszolt, majd a kísérlet végére (21. perc) csaknem minden sejt intracelluláris Ca^{2+} koncentrációja megemelkedett. Ezzel szemben a többi vegyület esetében jelentős akut deszenzibilizációt találtunk.

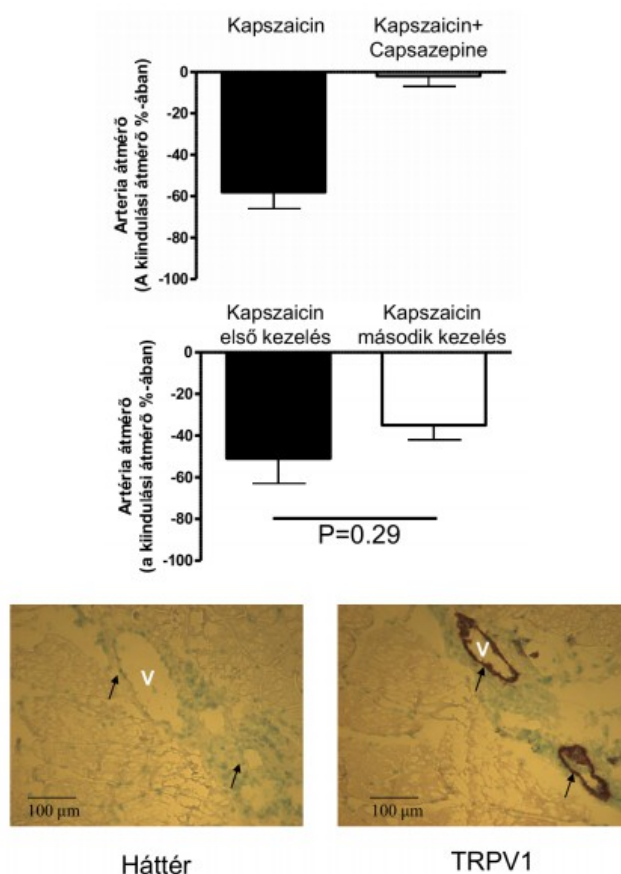
Eredményeink szerint a foszforilációs állapot eltérően érinti a receptorok ligandok iránti érzékenységét (Pearce et al. 2008). Az agonisták esetében csaknem 8-szoros érzékenyítés (DA5018 esetében) mellett megfigyeltünk olyan vegyületet is, amely esetében a foszforilációs állapotnak nem volt jelentősége (például resiniferatoxin). Az antagonistá vegyületek esetében egy másik irányú tendenciát figyeltünk meg: a receptor foszforiláltsági szintje sokkal kiegyenlítettebben érintette a vegyületek hatékonyságát, viszonylag kismértékű csökkenést okozva a vegyületek hatékonyságában. Egyetlen kivétel talán a SB-366791, amelynek kezeletlen sejteken is viszonylag szerény aktivitása volt, és ez a receptor foszforilációjának emelkedésével jelentősen csökkent.

2.5. A vaszkuláris TRPV1

Magyarországra hazatérve a molekuláris farmakológia eszközeit és lehetőségét sajnos elvesztettem. A TRPV1 területén figyelmem az élettani hatásokra és azon belül a vaszkuláris hatásokra irányult. Először azt vizsgáltuk, hogy a TRPV1 stimuláció milyen hatással van vázizomerekre. 1 μ M kapszaicin jelentős konstriktiót váltott ki (Lizanecz et al. 2006). A vazokonstriktióért felelős TRPV1 ebben a rendszerben nem mutatott teljes tachyphylaxist, azaz ismételt alkalmazásra a vazokonstriktió újra jelentkezett. A receptor elhelyezkedését vizsgálva azt a patkány vázizom artéria simaizom rétegében találtuk immunhisztokémiával (10. ábra).

Ezt követően megkíséreltük a vaszkuláris TRPV1 aktivációjának lehetséges módjait feltérképezni. A TRPV1 endogén ligandnak gondolt anandamid esetében nem kaptunk vaszkuláris hatást ebben a rendszerben, azonban a receptor érzékenyítését (ciklosporin-A) követően az anandamid is konstriktiót váltott ki. Ami talán még fontosabb megfigyelés volt, hogy az erek anandamiddal történő kezelést követően deszenzibilizálódtak kapszaicinre, tehát anandamid kezelést követően nem volt kapszaicin válasz. Ez a deszenzibilizáció azonban megfordítható volt a foszfátáz gátló ciklosporin-A alkalmazásával. Az anandamid válaszok foszforilációval történő szabályozását részleteiben vizsgáltuk CHO-TRPV1 sejtek felhasználásával. Eredményeink szerint az anandamid hatáserőssége és hatékonysága egyaránt nagyobbak bizonyult a TRPV1 foszforilált

formájához. Az is fontos megfigyelés volt, hogy az anandamid sejten belüli lebomlásának gátlása a szabad zsírsav amid hidroláz (FAAH) gátlásával (PMSF alkalmazásával) jelentősen, a foszforiláció elősegítésével összemérhetően fokozta az sejtek anandamidra való érzékenységet. A vaszkuláris kísérletek azt sugallták, hogy az anandamid a TRPV1 deszenzitizálásával képes lehet a TRPV1 további agonista stimulusokra adott válaszainak gátlására.



10. ábra: Funkcionális TRPV1 expresszió patkány vázizomerekben

A kísérletekben a kapszaicin hatásait vizsgáltuk patkányok vázizomából izolált artériákon. A kapszaicin (1 μ M) az arteriolák konstriktójához vezetett, amit a capsazepine felfüggesztett (felső grafikon). A kapszaicin által kiváltott konstriktó tekintetében ezen erek esetében megfigyelhető volt a tachyphylaxis jelensége, amikor a kapszaicin ismételt alkalmazása az első válaszhoz képest kisebb átmérőcsökkenést okozott (középső ábra). Végül a vázizomereket TRPV1 specifikus antitesttel inkubáltuk, majd az antitestek kötődését DAB-bal mutattuk ki (alsó ábrák) (Lizanecz et al. 2006).

Ezt követően vizsgáltuk az anandamid foszforilációt elősegítő kezelések során jelentkező látszólagosan nagyobb válaszkészségének okát az egyedi CHO-TRPV1 sejtek esetében intracelluláris Ca^{2+} koncentráció mérések alapján. Az eredmények szerint az anandamid gyorsan deszenzibilizálódó részleges hatást fejtett ki CHO-TRPV1 sejtekre, amely a foszforilációt elősegítő

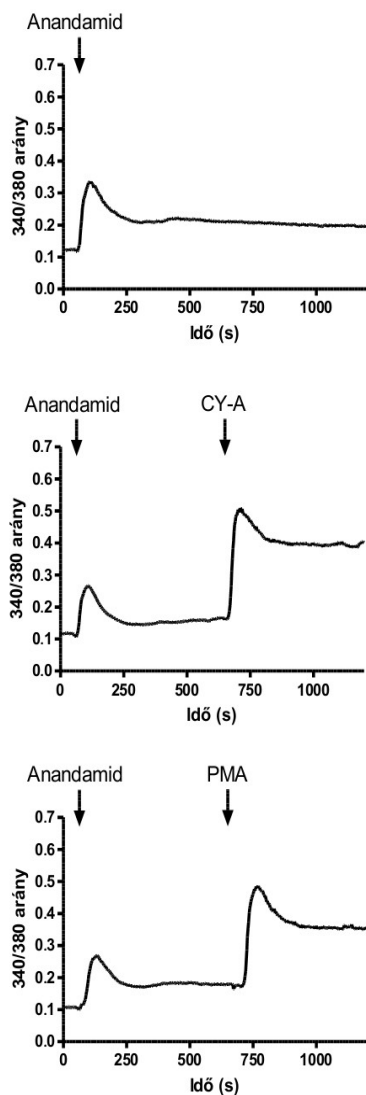
kezelések után jelentősen megemelkedett, és a kezelés után a deszenzibilizáció jelensége sem volt már számottevő. Annak eldöntésére, hogy a folyamatosan jelenlévő, kis koncentrációjú anandamid mellett hogyan válaszolhatnak a sejtek különböző metabolikus hatásokra, CHO-TRPV1 sejteket kezeltünk anandamiddal, majd foszforilációt növelő kezeléseknek tettünk ki. Az adatok szerint az anandamid által kiváltott viszonylag kismértékű stimuláció (részleges agonizmus) a foszforiláció fokozására jelentősen növekedett.

További kísérleteinkben próbáltuk a kapszaicin kiváltott arteriális konstriktó mechanizmusát felderíteni (Kark et al. 2008). Ennek érdekében immunhisztokémiai módszerekkel festettük a vázizomban és bőrben a neuronokat (neurofilament ellenes antitesttel). Eredményeink szerint a bőrben számos idegsejt nyúlványa helyezkedik el az erek környékén, ezzel szemben a vázizomban az artériák környezetében nincsenek jelentős számban idegvégződés. Ez arra utalt, hogy a vázizomban a TRPV1 stimulációnak tulajdonított jelenség feltehetőleg kisebb jelentőségű lehet, az erek környékén futó idegvégződésének hiánya miatt. Ennek eredményeként a simaizom rétegben expresszáldó TRPV1 hatásai nagyobb jelentőségűek lehetnek, és aktivációjának következménye konstriktó lesz. Ezen konstriktó pontos mechanizmusának feltárása érdekében további kísérleteket folytattunk. Ennek során először a TRPV1 funkcionális tulajdonságait vizsgáltuk ebben a rendszerben. A kapott adatok szerint a kapszaicin 1 μ M-os koncentrációban már teljes mértékű artéria konstriktót váltott ki, ami arra utalt, hogy a jelenség csakugyan specifikus lehet a TRPV1-re. A kapszaicin kiváltott konstriktó időlegesnek bizonyult, a kapszaicin jelenlétében egy jelentős vazokonstriktót követően az ér válaszkészsége csökkent és a 20 perces inkubáció végére az érátmérő a kiindulási értékre tért vissza.

Megkíséreltük a vazokonstriktóért felelő TRPV1-et expresszáldó sejtípus azonosítását is. A funkcionális kísérletekben felhasznált vázizom artériát tartalmazó szövetben immunhisztokémiai módszerrel tettük láthatóvá a TRPV1-et a simaizom aktinnal együtt festve. A TRPV1 és a simaizom specifikus festődés egybeesése a receptor simaizomsejtekben történő expressziójára utalt. A TRPV1

dc_652_12

mRNS-ének jelenlétét sikerült kimutatnunk egy immortalizált simaizom sejtvonalon is (A7r5 sejtek), amely tény ismét arra utalt, hogy a TRPV1-et expresszáló sejtvonalt arteriális simaizom lehet.



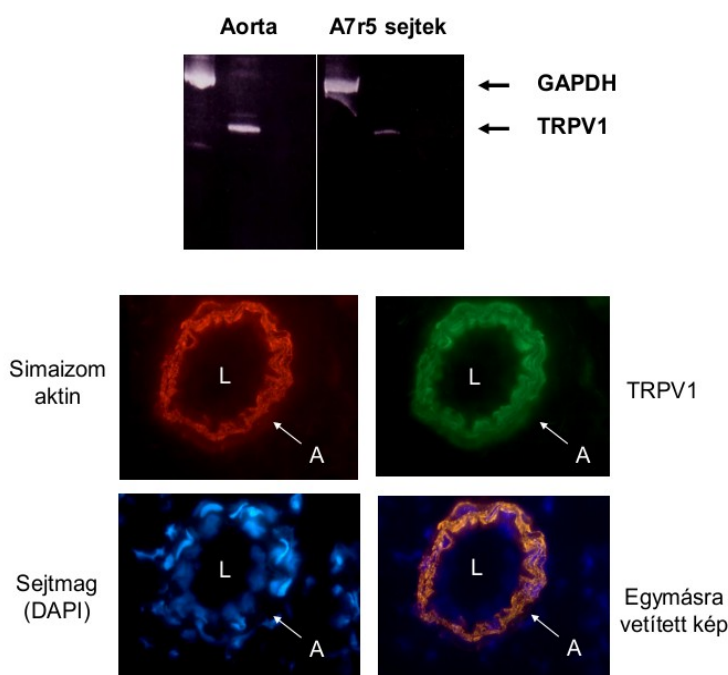
11. ábra: Foszforiláció hatása alacsony dózisu anandamiddal történő kezelés során

Az anandamid erős deszenzibilizáló hatással rendelkezett (Error: Reference source not found, felső grafikon). Annak eldöntésére, hogy az anandamid jelenlétében a deszenzibilizált receptor reszenzitizálható-e foszforilációhoz vezető stimulusok hatására a CHO-TRPV1 sejteket a az anandamid jelenlétében a deszenzibilizáció fázisában kezeltünk PMA-val és ciklosporin-A-val (CY-A). Az ábrán az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változásokat tüntettük fel az anandamid folyamatos jelenlétében (Lizanecz et al. 2006).

A TRPV1 arteriális simaizomban történő funkcionális expresszióját azonban csak egy későbbi munkánkban tudtuk kétséget kizárólag igazolni (Czikora et al. 2012). Ennek során először a kapszaicin hatására megfigyelt vazokonstrikció TRPV1 specifikását vizsgáltuk. A kísérletekben farmakológiai és genetikai úton gátoltuk a TRPV1 funkciót, és megfigyeltük a kapszaicin

dc_652_12

válaszkészség változását. A farmakológiai gátlás során az AMG-9810 antagonistá növekvő dózisa mellett határoztuk meg a vazokonstriktio kapszaicin dózis függését. Az eredmények szerint a kapszaicin az AMG9810-zel kompetitív módon okozott vazokonstriktiót, továbbá a vazokonstriktio TRPV1 génhányos egerben nem volt megfigyelhető.



12. ábra: TRPV1 expresszió vázizomerek simaizomsejtjeiben

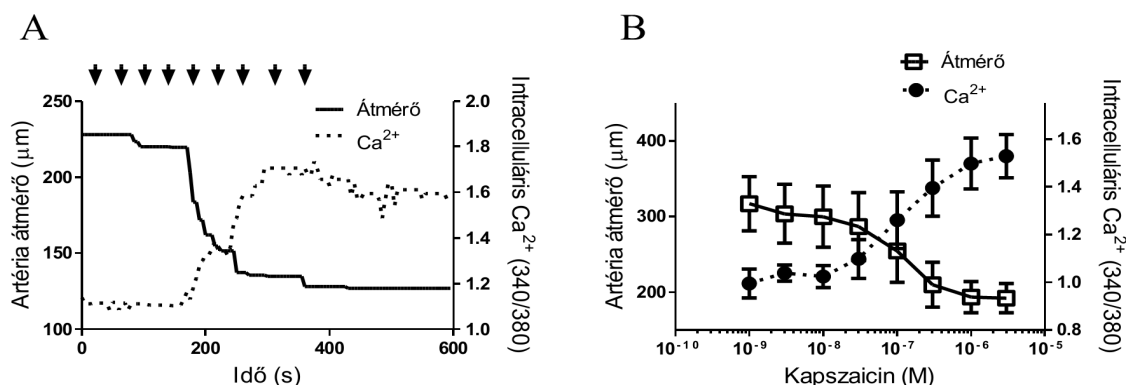
A megfigyelt hatásokkal leginkább összhangban a TRPV1 vaszkuláris simaizomban történő expressziója állt. Ennek igazolása érdekében immunhisztokémiát választottunk. Az erekben a simaizomsejteket aktin specifikus antitesttel mutattuk ki (piros szín), a TRPV1-et zölddel, a sejtmagokat pedig DAPI-val (kék) jelöltük. A három színnel rögzített képeket átlapolva is mutatjuk. Végül a TRPV1 expressziót immortalizált A7r5 simaizomsejtekben is igazoltuk RT-PCR reakcióval (Kark et al. 2008).

Ezt követően erőfeszítést tettünk arra, hogy a vazokonstriktio mechanizmusát feltárjuk.

Ehhez a vázizom artériák esetében párhuzamosan mértük az átmérőváltozást és a simaizom rétegben az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációváltozásokat. Az eredmények szerint a vazokonstriktio egybeesik az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció megemelkedésével (13. ábra).

Annak igazolására, hogy az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedése a simaizomban expresszáldó receptor aktiválásának közvetlen következménye, simaizomsejteket izoláltunk és kapszaicinnal kezeltünk. A kezelés hatására a simaizomsejtek egy jelentős részénél intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedést kaptunk, ami összemérhető volt a KCl által kiváltható (maximális)

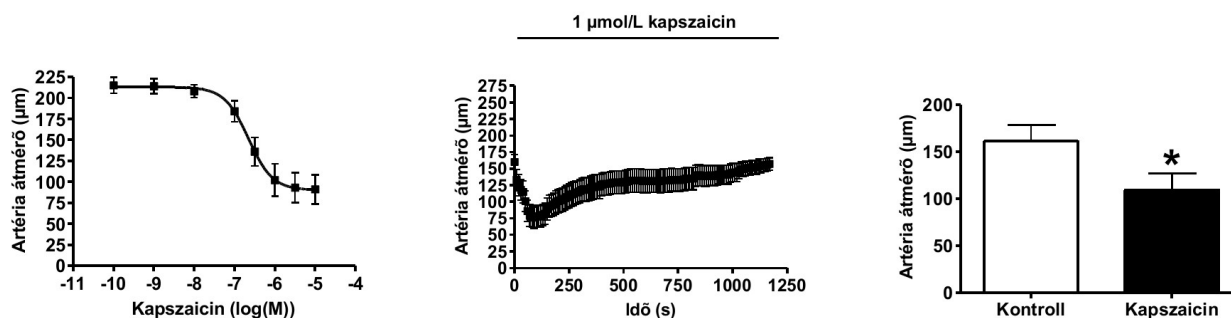
növekedéssel.



13. ábra: A TRPV1 aktiváció intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedésén keresztül fejt ki hatását

Annak igazolása után, hogy a kapszaicin kiváltott vazokonstrikció TRPV1 mediált, annak mechanizmusát is vizsgáltuk. Eddigi eredményeink erősen utaltak arra, hogy a mechanizmus alapját a vaszkuláris simaizmokba TRPV1-en keresztüli Ca^{2+} belépés jelenti. Ennek igazolására két kísérletet végeztünk. Itt az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változást mértük az érátérő változással párhuzamosan. A bal oldali grafikon egy individuális kísérlet eredményét mutatja, míg a jobb oldali ábrán 5 kísérletben kapott adatok átlagát mutatjuk (Czikora et al. 2012).

A TRPV1 vaszkuláris simaizomban történő expressziójának igazolását követően a simaizomban lokalizálódó TRPV1 farmakológiai tulajdonságait is meghatároztuk. Ennek keretében a korábban a TRPV1 sejtes válaszok kinetikájának vizsgálatára alkalmazott agonistákkal történő kezelés hatásait vizsgáltuk. Először a kapszaicin hatásait reprodukáltuk.



14. ábra: Kapszaicin hatásai a simaizomban lokalizálódó TRPV1-re

A kapszaicin patkány vázizomból izolált arteriolában endogénen expresszáldó TRPV1-re gyakorolt hatásait vizsgáltuk referenciaként a többi, később bemutatott TRPV1 agonistához. A bal oldali grafikon a kapszaicin dózis-hatását láthatjuk az erek átmérőváltozására. A középső grafikon a maximális dózisú (1 μM) kapszaicin hatásait mutatja, és végül a harmadik grafikon a kezelést követően (20 perc kezelés, ennek eredménye látható a középső grafikonon, majd az ereket mosattuk és 40 percig regeneráltuk) alkalmazott kapszaicin érhátását mutatja (Czikora et al. 2012).

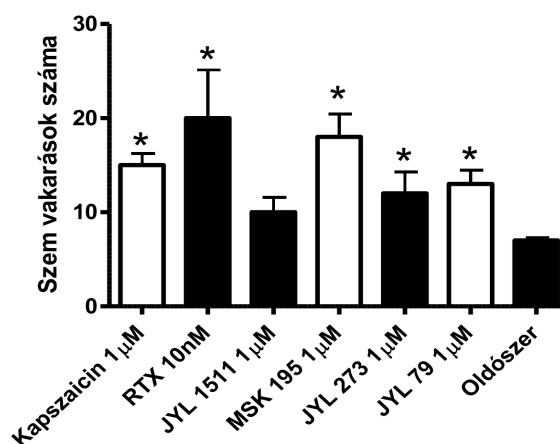
A kapszaicint a resiniferatoxin követte. A resiniferatoxin esetében nem kaptunk semmilyen kézzelfogható érválaszt, azonban a kezeléseket követően a TRPV1 nem volt kapszaicinnal

ingerelhető, teljes deszenzibilizáció volt megfigyelhető. Kapszaicin szerű választ kaptunk az MSK-195 és JYL-79 vegyületekkel. Ezzel szemben resiniferatoxin szerű választ kaptunk a JYL-279 és JYL-1511 vegyületekkel.

Erőfeszítéseket tettünk a vaszkuláris TRPV1-en kapott struktúra-aktivitás összefüggések összehasonlítására a szenzoros neuronban expresszáldó receptorok hasonló paramétereivel. A szenzoros neuronális funkciót a vegyületek szembe cseppentésével teszteltük, amely kísérlet során az állatok a TRPV1 aktivációt követő irritációval arányosan vakarták a szemüket. A szenzoros neuronon kapott érzékenység adatok alapján a JYL-1511 kivételével minden TRPV1 agonista irritatívnak bizonyult. Ez nem volt teljesen összhangban a vaszkuláris TRPV1-gyel kapott adatokkal.

15. ábra: Az alkalmazott TRPV1 agonisták irritatív hatásainak vizsgálata

A vaszkuláris preparátumon tesztelt vegyületeket a szenzoros neuronokban endogénen expresszáldó receptoron is teszteltük. Ennek érdekében patkányok szemébe cseppentettünk az oldatokból és számoltuk az irritatív hatás miatti



szemvakarások számát. Az ábrán kitöltött oszlopokkal jelöltem azokat az agonistákat, amelyek az artéria átmérőt nem befolyásolták akut hatásként, míg üres oszlopok jelölik azokat, amelyek esetében az alkalmazásukat rövidesen követő jelentős konstriktio volt megfigyelhető (Czikora et al. 2012).

A TRPV1 vaszkuláris biológiai szerepének vizsgálatát az értekezés beadásáig megjelent közleményeinkben az anandamid vazoaktív hatásainak tanulmányozásával zártuk (Czikora et al. 2012). Ennek során kimutattuk, hogy az anandamid tartós kezelése során bifázisos hatással először az erek összehúzódását (nagy dózisban), majd dilatációját váltja ki. A dilatációban feltételeztük a

miogén tónus elvesztésének szerepét, amelynek igazolására végzett kísérleteink szerint az anandamid kiváltott vazóaktív hatásokban a dilatatív válaszok dominálnak, jóllehet magasabb koncentrációban gyakran megfigyelhető egy tranziens konstriktio is. A dilatáció hátterében az anandamid lebontása állhat, amennyiben az anandamid kiváltotta dilatáció teljes mértékben gátlható volt az anandamidot arachidonsavvá metabolizáló enzim (FAAH) gátlásával. Endotél fosztott erekkel végzett kísérletekben az anandamid hatására nem változott a miogén tónus. Összefoglalva, eredményeink tehát arra utalnak, hogy az anandamid aligha lehet a vaszkuláris TRPV1 aktivációjához szükséges endogén ligand. Sokkal valószínűbb az, hogy ha az anandamid hat a TRPV1-re ebben a rendszerben, akkor az gátló hatásként jelentkezik (Tóth et al. 2009).

3. Az új eredmények összefoglalása

A TRPV1 egy nonspecifikus kationcsatorna, amelyről az a kép alakult ki, hogy expressziója specifikus az érző neuronokra, ahol a fájdalmas ingerületek létrejöttében kulcsszerepe van. Ez a TRPV1-et a gyógyszerkutatások egy fontos célpontjává tette.

Részt vettem egy molekuláris farmakológiai programban, ahol a TRPV1-en biológiai hatással rendelkező ligandokat fejlesztettünk. A fejlesztés eredményeképpen pikomoláris tartományban ható agonistákat és antagonistákat fejlesztettünk. Kimutattuk, hogy a vanilloidokban található fenolos hidroxil csoport helyettesítése metánszulfonamid csoporttal egy metabolikusan stabilabb, antagonizmust preferáló szerkezethez vezet. A TRPV1-en ható ligandok közül sikerült az ultrapotens resiniferatoxin szerkezetének egyszerűsítésével jelentős kötőképességgel és hatékonysággal rendelkező molekula templátokat fejleszteni.

A TRPV1 élettani funkcióját tekintve felvetettük hogy a TRPV1 arteriális simaizomsejtekben is expresszáldhat, ahol aktivációja vazokonstriktiohoz vezet. Ezt a hipotézist később farmakológiailag, TRPV1 funkció hiányos egérben és izolált sejteken is megerősítettük. Az arteriális simaizomsejtekben expresszáldó TRPV1 farmakológiai tulajdonságainak feltárását megkezdjük, eddig az agonista vegyületekkel kapott eredményeket publikáltuk. Kimutattuk, hogy

az arteriális simaizomban expresszáldó TRPV1 farmakológiai tulajdonságai eltérnek az érző neuronban expresszált receptorétól. Körvonalazódott, hogy a TRPV1 szövetspecifikusan vehet részt a vérkeringés szabályozásában, amely expressziós szabályozás alatt állhat. A bőrben a TRPV1 elsősorban dilatatív hatásokat közvetít, míg a vázizomban konstriktív hatásai vannak. Ezzel világossá vált, hogy az arteriális TRPV1 fontos szerepet játszhat a szöveti véreloszlás szabályozásában. Végül felvetettük, hogy az arteriális simaizomban expresszáldó TRPV1 szelektív aktivációja a közvetlen Ca^{2+} beáramlást kiváltó hatása miatt farmakológiai célpont lehet olyan állapotokban, amikor a vérnyomás emelése szükséges.

4. Megbeszélés, az eredmények potenciális hasznosítása

Közreműködésemmel több, mint 250 TRPV1-re ható vegyület szerkezetét, szintézisét és *in vitro* farmakológiai tulajdonságait publikáltuk, számos molekuláris modellel együtt. Ezzel a Peter M. Blumberg és Jeewoo Lee által vezetett kutatócsoport a TRPV1 molekuláris farmakológiája terén jelentős hatással volt a tudományterületre. Saját közreműködésem ezen a területen közvetlenül a biológiai aktivitás meghatározásához köthető. Az értekezésben bemutatott közleményekben publikált [^3H]RTX kötődési, illetve $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvételi adatoknak nagyjából 20-25%-a az én méréseimen alapszik.

A molekulák kémiai és farmakológiai tulajdonságainak meghatározásán túl fontosnak tartom, hogy közleményeinkben igyekeztünk a nyers adatokon túl a molekuláris struktúra-aktivitás összefüggésben felismert általánosságokat is bemutatni. Közleményeinkben és a mindennapi erőfeszítések során is a legnagyobb jelentősége az „A” régiónak volt. Ez az a régió, amelyről a vanilloidok nevüket szerezték. Az „A” régiónak jelentős szerepe van a hatás jellegének meghatározásában (16. ábra). A hatás jellegét tekintve a vanillin csoport benzolgyűrűjén történő szubsztitúciókkal lehet a kifejlesztett molekulák hatását modulálni: agonista-antagonista kontinuumban, anélkül hogy a molekulák TRPV1 iránti hatékonysága jelentősen változna.

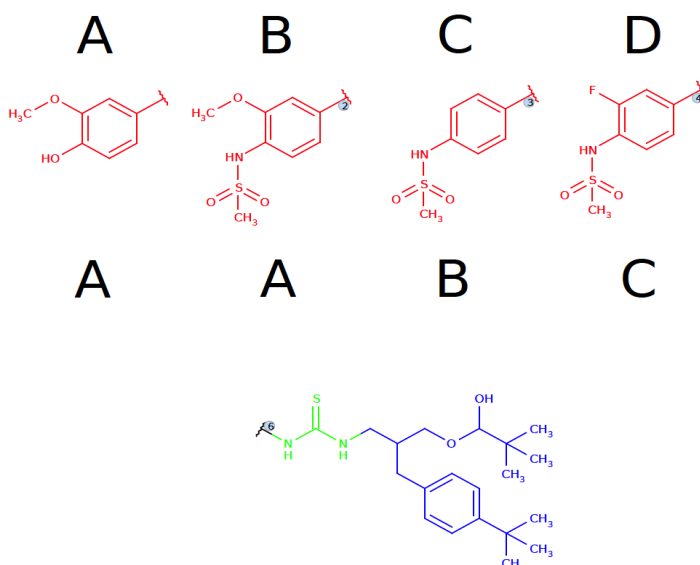
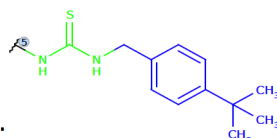
A „B” régió jobbra az a kapcsoló régió, amelyben az „A” és „C” régióban használt molekuláris struktúrákat reakcióképes kémiai csoportokkal összekötik. A „C” régió szerepéről általánosságban megállapítottuk, hogy a molekulák hatékonyságának szabályozása mellett részt vesz a biológiai hatás kialakításában is. A kapott adatok alapján bizonyos struktúrák árnyalni képesek az „A” régió térszerkezete alapján sugallt hatást (16. ábra).

A: Agonista

B: parciális agonista

C: antagonist: vanilloid

D: antagonist: vanilloid, pH, hő...



16. ábra: A "C" régió szerepe a biológiai aktivitás meghatározásában

A TRPV1 ligandok szerkezetében a „C” régió módosításai képesek a különböző „A” régióbeli szerkezetek aktivitásának módosítására, annak ellenére, hogy az általános tendenciák nem változnak.

A TRPV1 ligandokkal való kísérletekben már a kezdetektől kerestük a biológiai hatásban fontos modalitásokat. Már a vezérmolekulák azonosítása során felfigyeltünk a parciális agonizmus jelenségére, és erőfeszítéseket tettünk annak érdekében, hogy a receptor környezetének módosító hatását meghatározzuk (Wang et al. 2002; Wang et al. 2003). Így sikerült feltárni, hogy az antagonizmus sem egy egységes jelenség: a TRPV1 számos módon aktiválható és a ligandok nem feltétlenül gátolják valamennyi aktivációs mechanizmust. A TRPV1 farmakológiával töltött évek alatt azt gondolom, hogy az azóta többé-kevésbé elfogadott modalitások mellett három másik fontos

körülményt is felvetettünk. Az egyik a ligandok penetrációjának a kérdése (Tóth et al. 2005), a másik a sejtekben potenciálisan előforduló eltérő tulajdonságú receptor populációk (Tóth et al. 2004), és a harmadik a foszforilációs állapot szerepe a hatékonyságban (Lizanecz et al. 2006; Pearce et al. 2008). Ezen modalitások szerepe felértékelődött a TRPV1 antagonisták alkalmazásának egyik legfontosabb mellékhatásának, a hipertermiának tükrében (Garami et al. 2010).

A ligandok (úgy mint kapszaicin és resiniferatoxin) eltérő membrán penetranciával rendelkeznek. Ennek megfelelően a sejtmembránon lassabban átjutni képes molekula számára az aktivitás befolyásolásához feltehetőleg több idő kell, mint az a gyorsan deszenzibilizálódó TRPV1 esetében a reakció során rendelkezésre áll. Ez az elképzelés összhangban van a TRPV1 intracellulárisan elhelyezkedő ligandkötő régióival (6. ábra), de látszólagos ellentmondásban van azzal a ténnyel, hogy a különböző módon viselkedő TRPV1 ligandok lipofilitása között korántsem fedezhetők fel általános viselkedésre utaló szabályszerűségek. Saját vizsgálataimban individuális CHO-TRPV1 sejteket vizsgáltam különböző agonista stimulusokra adott válaszaik alapján (9. ábra). Fontos megfigyelés volt, hogy az individuális sejtek esetében is megfigyelhető volt a resiniferatoxinra és a kapszaicinre jellemző eltérő viselkedés. A kapszaicin esetében a dózis növelésére az individuális sejtek Ca^{2+} koncentrációja az alkalmazott dózis függvényében emelkedett meg, azaz minden sejt válaszolt, az alkalmazott kapszaicin koncentrációval összevethető mértékben. Kevés kapszaicin minden sejtben kis változást okozott, nagy koncentrációjú kapszaicin minden sejtben maximális választ adott. Ezzel szemben a resiniferatoxin esetében a sejtek látszólag minden vagy semmi jelleggel válaszoltak: ha egy sejt aktiválódott, akkor a kapszaicinnal összemérhető maximális választ adott, függetlenül az alkalmazott resiniferatoxin dózistól. Ebben az utóbbi esetben a koncentráció-hatás összefüggés alapja az volt, hogy a növekvő resiniferatoxin jelenlétére a sejtek hamarabb kerültek aktivált állapotba és válaszoltak maximális intracelluláris Ca^{2+} emelkedéssel. Ezt a szép összhangban lévő képet azonban megzavarja az a tény, hogy ilyen

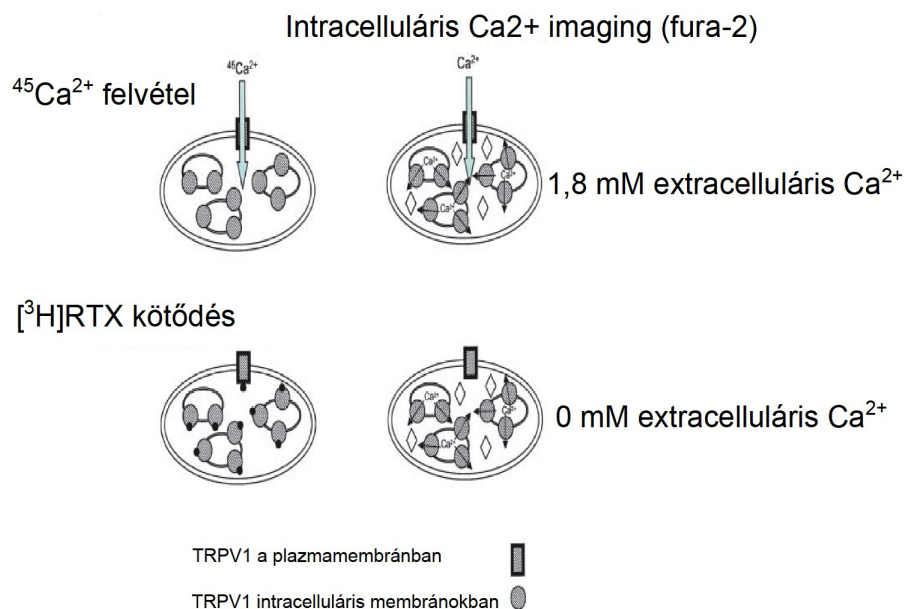
jellegű különbségek nem csak a jelentős szerkezetbeli különbségekkel rendelkező resiniferatoxin és kapszaicin között voltak megfigyelhetőek, hanem olyan strukturálisan sokkal közelebb álló vegyületek esetében is, mint a JYL-79 és az MSK-195. Ezen utóbbi vegyületek esetében a strukturális különbségek láthatólag nem a membrán-permeabilitásra gyakorolt hatással függöttek össze. Az itt megfigyelt egyedi viselkedés tehát azt sugallja, hogy a TRPV1 ligandspecifikus modulálásának membrán-permeabilitástól független elemei is vannak.

Összességében az adatok azt sugallják, hogy a TRPV1 ligandok penetranciája az intracelluláris ligandkötéssel összhangban jelentősen befolyásolja látszólagos aktivitásukat. Ezen *in vitro* jelenségnek komoly *in vivo* következményei lehetnek, amennyiben a tartósan állandó gyógyszerkoncentrációk mellett a lassan penetráló TRPV1 antagonistáknak más hatásai lehetnek, mint a rövid ideig tartó funkcionális mérések során.

Egy másik modalitás lehet, hogy a TRPV1 ligand kötése függ a receptor környezetétől. Ilyen különbséget jelenthet a lipid környezet, amely a receptor ligandokkal való kölcsönhatását befolyásolhatja. Ami azt illeti vannak is adatok arra, hogy a különböző membrán komponensek szintézisének gátlása, vagy eltávolítása sejtek membránjából befolyásolja a TRPV1 ligand szelektivitását (Szőke et al. 2010). Eszerint a TRPV1 mikrokörnyezetében lévő lipid komponensek nem csak a receptor gátlásáért lehetnek felelősek (Prescott, David Julius 2003), hanem annak ligand szenzitivitásaért is, ezzel egy újabb rétegét adva a modalitásnak.

Saját kísérleteinkben találtunk erre a jelenségre utaló adatokat CHO-TRPV1 sejtekben, ahol a TRPV1 túlnyomó többsége (a szenzoros neuronoktól eltérően) intracelluláris membránokban expresszálódik. Az IBTU (7. ábra) farmakológiai tulajdonságait vizsgálva azt találtuk, hogy az funkcionális kísérletekben hatékonyan gátolta a TRPV1 kapszaicin és resiniferatoxin általi aktivációját, de nem volt képes nagyságrendekkel nagyobb koncentrációban sem leszorítani a [³H]RTX-et a receptorról, továbbá befolyásolni a resiniferatoxin általi intracelluláris TRPV1 aktivációt. Ezen adatok azt a hipotézist támogatják, hogy a TRPV1 farmakológiai tulajdonságainak

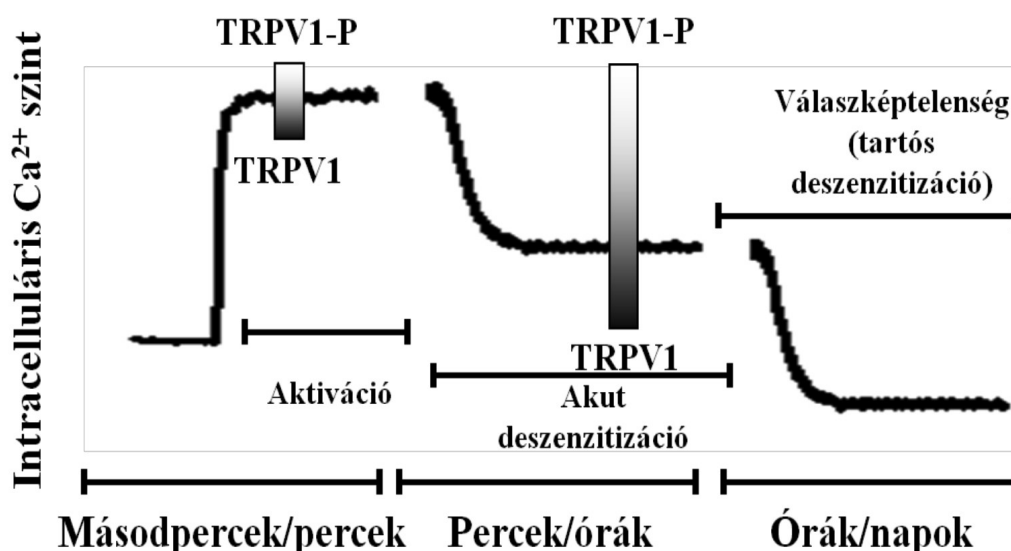
mérésére szolgáló módszerek eltérő modalitásokat céloznak, amelyek esetenként eltérő lokalizációban is megnyilvánulnak. A CHO-TRPV1 sejtekben a $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvétel a plazmamembránban található receptor funkcióját méri. Ezen sejtekben a TRPV1 túlnyomó része intracellulárisan helyezkedik el, emiatt a $[^3\text{H}]\text{RTX}$ kötődési kísérletekben feltételezhetően a receptorok többségét adó intracelluláris receptor populációhoz való kötődést határozzuk meg, és végül, az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció mérése során feltételezhetően a plazmamembránon és az intracelluláris membránokon keresztül áramló Ca^{2+} ionokat egyaránt mérjük (17. ábra).



17. ábra: A TRPV1 funkcionális tulajdonságainak mérésére szolgáló eszközök

Az IBTU-val kapott adataink konzisztensek azzal a feltételezéssel, hogy az IBTU csak a plazmamembránban található receptorokkal lép kölcsönhatásba. Ezen tulajdonsága az IBTU-t különösen alkalmassá tette arra, hogy a plazmamembránban lokalizálódó TRPV1 funkcióját az esetlegesen intracellulárisan expresszáldó receptortól elkülönítsük. Az IBTU-val végzett állatkísérletek szerint az IBTU az általunk plazmamembránon meghatározott *in vitro* hatékonyságával arányosan gátolta a fájdalmat *in vivo* modellekben (Tang et al. 2007).

Munkánk egy része a TRPV1 endogén agonistáinak vizsgálatára irányult. Ennek keretében teszteltük az anandamid és az N-arachidonil dopamin hatékonyságát CHO-TRPV1 sejteken. Eredményeink mindkét esetben azt sugallták, hogy az eredeti közleményekben leírt hatékonyságnak csak mintegy tizede-százada a jellemző a heterológ rendszerben expresszált TRPV1-re. Továbbá az is világossá vált, hogy az anandamid parciális agonistaként viselkedik a TRPV1-en. Ezen anandamid hatásról mind CHO-TRPV1 sejteken, mind izolált vázizom artériákon azt mutattuk ki, hogy stimulálatlan körülmények között leginkább gátolja a TRPV1 nagyobb hatáserősségű agonistákkal történő aktivációját. Ezen megfigyeléseink egyébként mások korábbi adataival is összhangban voltak (Szöke et al. 2000). Annak felvetése, hogy a foszforiláció szabályozhatja az anandamid kiváltott válaszokat újszerűbbnek volt tekinthető. CHO-TRPV1 sejtekben az anandamid alkalmazása jelentős mértékű deszenzibilizációt okoz, mely fázisban a TRPV1 ligand-kötött, de gátolt állapotba kerül. Ezen szakaszban a TRPV1 foszforilációs szintjének eltolása a receptort képes volt teljes mértékben aktiválni. Ez arra utalt, hogy az endogén deszenzibilizáló ligandok jelenlétében a receptor foszforiláció által szabályozott ioncsatornaként viselkedhet (18. ábra).



18. ábra: TRPV1 regulációja foszforilációval deszenzibilizáló agonista jelenlétében

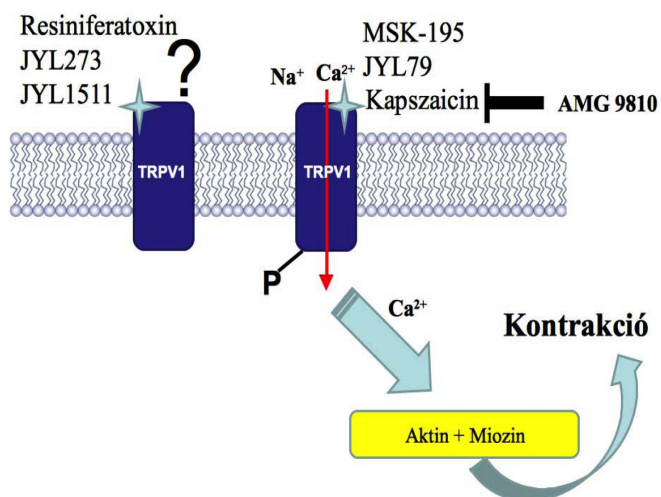
A foszforilált állapotban lévő TRPV1-et a ligandok aktiválják, melynek hatására a csatorna kinyílik és az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció megemelkedik. Ezt az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedést az esetek egy részében követi a receptor deszenzibilizációja, aminek következtében az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció is csökken. Ezen állapotban, amikor a receptor ligandja kötődik a receptorhoz, de nem képes a deszenzibilizált receptoron számottevő hatást kifejteni nagy szerepe lehet olyan metabolikus hatásoknak, mint például a foszforiláció. A TRPV1 foszforilációja ugyanis a receptor deszenzibilizációjának csökkentésével jelentős módon tudja befolyásolni a receptor aktivitását. A TRPV1 aktivációja ugyanakkor előnytelen a sejtnél, hiszen a megemelkedett intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt valamilyen mechanizmussal csökkentenie kell. Ennek egyik módja a TRPV1 sejt felszíni expressziójának csökkenése, amely a TRPV1 válaszkészség tartós csökkenéséhez vezet.

Végül, hazai kutatásaim talán legfontosabb eredménye a TRPV1 arteriális simaizmokban történő funkcionális expressziójának kimutatása volt. A TRPV1 kutatásának igen nagy lökést jelentett a TRPV1 klónozása, azonban az eredeti közlemény zsenialitása mellett félrevezető volt, hogy a TRPV1 expresszióját kizárólag a szenzoros neuronokban írták le és a receptor funkcióit is csak ennek tükrében tárgyalták (Caterina et al. 1997; M. Tominaga et al. 1998; Caterina et al. 2000). Ezzel az időközben gőzerővel beinduló gyógyszerügyi kutatások olyan nem várt *on-target* mellékhatásokba futottak, mint a hipertermia. Saját *in vitro* adataink arra utalnak, hogy a TRPV1 keringés-szabályozásban betöltött szerepe és jelentősége lehet a következő olyan *on target* mellékhatás oka, amely visszavetheti a TRPV1-en ható gyógyszerek fejlesztését.

A TRPV1 arteriális simaizomban történő expressziója persze nem volt ismeretlen, pusztán kevésbé elfogadott kísérleteink kezdetén. Már 1982-ben leírták, hogy a kapszaicin intravénás alkalmazását követően változatos vaszkuláris hatások jelentkeznek, amelyek szövetspecifikusak

lehetnek. Már ezen nagyszerű közleményben leszögezték, hogy az újszülött korban végzett kapszaicin kezeléssel deszenzitizált állatok esetében a vazokonstriktív hatás nem tűnik el, és azt, hogy ez egy közvetlen érhatásnak tulajdonítható, szemben a vazodilatatív hatással, ami szenzoros neuron függő volt (Donnerer, Lembeck 1982). A kapszaicin hatásait vizsgálva vázizomban mások is azt találták, hogy az direkt vazokonstriktív hatással van a vázizomban (Cameron-Smith et al. 1990). A cerebrovaszkuláris keringést vizsgálva írtak le már igen korán kapszaicin kiváltott hatást, mely dóziszfüggően jelentkezett: alacsony dózisban a kapszaicin vazodilatációhoz vezetett, míg magasabb dózisban vazokonstriktiót váltott ki (Edvinsson et al. 1990). Ugyanezek a szerzők kísérletes adataik alapján már ekkor rögzítették azt, hogy míg a dilatáció neuronális hatás, addig a vazokonstriktió esetében az erekbe történő közvetlen Ca^{2+} beáramlást kiváltó hatásról van szó. Arról, hogy ez a konstrikatív hatás humán erek esetében is megfigyelhető lehet, koronária bypass műtéteken átesett betegek graft artériái esetében kapott eredmények tájékoztattak (Canver et al. 1997). Végül, a kapszaicin vazokonstriktiót kiváltó hatásait magyar kutatócsoportok is leírták kutya mezenterialis erekben (Robert Pórszász et al. 2002), patkány koronáriákon (Szolcsányi et al. 2001) és patkány agyi erek esetében (Dux et al. 2003).

A TRPV1 neuronális hatásait kívántam jellemezni a vazodilatatív hatáson keresztül. Ezért számos szövetből eret izoláltunk és kerestük azt a szövetet, ahol a TRPV1 stimulációra a dilatatív hatás a legszembetűnőbb. Az adott altatási és preparálási körülmények között az irodalomban leírt vazodilatatív hatással szemben vázizomerekben nagyon jelentős vazokonstriktiót kaptunk. Eddigi publikált eredményeink ezen vazokonstriktió mechanizmusára és az arteriális receptor farmakológiai tulajdonságainak vizsgálatára irányultak. Adataink során kimutattuk, hogy a TRPV1 a simaizomsejtekben expresszálódik és így aktivációja közvetlenül vezet el az összehúzóódáshoz szükséges intracelluláris Ca^{2+} emelkedéshez (19. ábra).



19. ábra: Az arteriális TRPV1 farmakológiája

A vaszkuláris TRPV1-ről eddig összegyűjtött adataink szerint a TRPV1 vaszkuláris expressziója szövet és az individuális erek szintjén szabályozott (eddig nem publikált adatunk). Ez teljes összhangban van a TRPV1 promóter aktiválódását érzékenyen mutató GFP expressziós transzgén egérben kapott eredményekkel (Cavanaugh et al. 2011), jóllehet Cavanaugh és munkatársai nem tudták az endogénen expresszáló TRPV1-et arteriális simaizomban immunhisztokémiai módszerekkel kimutatni, csak a TRPV1 promóter aktivitását a GFP expresszió alapján. Ezen megfigyelésüket, miszerint a TRPV1 antitestek specifitása erősen kérdéses, saját eredményeink is alátámasztották. Egy kísérletsorozatban hat TRPV1 antitestet teszteltünk, melyek közül mindössze kettő volt TRPV1-re specifikus a hátsógyöki ganglion szenzoros neuronjainak festése alapján. Ezen két antitest közül a vaszkuláris simaizomban expresszálódó TRPV1-et csak az egyik mutatta ki (eddig nem publikált adatunk). Ezen megfigyelés egyik számunkra nagyon fontos üzenete, hogy az epitópok elérése nem egyforma a szenzoros neuronokban és a simaizomban expresszálódó TRPV1 esetében, ami eltérő térszerkezetre, molekuláris interakciójukra utal, aminek szabályozásukban is fontos szerepe lehet.

Adataink szerint az újszülött korban végzett kapszaicin deszenzibilizálás nem érinti a vázizomerekben a TRPV1 expressziót és válaszkészséget, míg csökkenti a szenzoros neuronális

válaszokat (eddig nem publikált adatunk). A TRPV1 gátlására irányuló terápiás eljárások terén fontos lehet, hogy az általunk tesztelt valamennyi TRPV1 antagonistá gátolta a simaizomban lokalizálódó receptort is (eddig nem publikált adatunk), ami arra utal, hogy esetleges alkalmazásuk esetén újabb on-target mellékhatások kialakulása valószínűsíthető. Végül, az is világossá vált, hogy a korábbi közleményekkel összhangban (Szolcsányi et al. 2001) a kapszaicin jelentős koronária konstriktiót vált ki kutyákban, egérben és patkányban (eddig nem publikált adatunk).

Itt kell azt is megjegyeznem, hogy a TRPV1 dilatatív hatásairól bizonyos esetekben félrevezető adatok jelenhettek meg, ami a dilatatív hatások eltúlzásához vezethetett. Ennek oka, hogy rendkívül elterjedten használt TRPV1 aktivátor kapszaicin mikromoláris tartományban a TRPV1 mellett gátolja a feszültségfüggő (L-típusú) Ca^{2+} csatornát a simaizomsejtekben és ezzel TRPV1 független módon vezet vazodilatációhoz (eddig nem publikált adatunk és (Hopps et al. 2012)). Ezen hatása miatt azon kísérletek, ahol mikromólos tartományban használják a szenzoros neuronok neurotranszmittereinek kiürítésére, illetve a neurotranszmitterek felszabadítására, félrevezető eredményt adhatnak. Mi több, ez a hatás nem csak a kapszaicinre, hanem általánosságban a vanilloidokra, mint kémiai struktúrákra látszik általánosnak (függetlenül attól, hogy a TRPV1-en agonisták, vagy antagonisták, nem publikált adatunk). Mindezek alapján tehát az irodalom jelentős számban tartalmaz olyan, kapszaicin érzékeny TRPV1-nek tulajdonított dilatatív hatást, amely nem TRPV1-re specifikus. Az érme másik oldala, hogy kétségtelenül létezik a TRPV1 stimulációnak dilatatív hatása. A szenzoros neuronok elektromos ingerlésével (akár a TRPV1 stimulációjával) valóban felszabadulnak vazodilatatív hatású neurotranszmitterek.

Összességében saját kutatásaink alapján az a kép alakult ki, hogy a TRPV1 stimuláció vaszkuláris hatásai a TRPV1 expresszió helye és mértéke által szabályozódik: ahol a perivaszkuláris szenzoros végződések száma csekély, és a TRPV1 expresszió simaizomban jelentős (például vázizom, szív), ott a TRPV1 aktiválása révén vazokonstriktiót látunk. Ott, ahol az innerváció jelentős és a simaizomokban lévő TRPV1 expresszió alacsony (például a bőr külső rétegeiben) a

Az arterioláris TRPV1 kapcsán a nagy kérdés, hogy mi az élettani funkciója? Egyáltalán van-e bármilyen funkciója? Ez farmakológiai szempontból azért fontos kérdés, mert ha van valamilyen élettani szerepe, akkor ezt a szenzoros neuronokra ható bevezetendő fájdalomcsillapító gyógyszerek gátolni fogják. Ez mellékhatásokhoz vezethet. Ennek a kérdésnek a megválaszolásához még sok kísérletes adatot kell gyűjteni. Tovább nehezíti a kísérletek értelmezését, hogy vaszkuláris biológiai értelemben az általunk tesztelt, specifikusnak tartott TRPV1 antagonisták esetében mindenféle érhatást: dilatációt, konstriktációt és hatástalanságot is megfigyeltünk (nem publikált adatok). Ezen adatok arra utalnak, hogy a mégoly specifikusnak tartott vegyületek esetében is előfordulnak TRPV1-től független hatások. További nehézséget jelent, hogy a TRPV1 mediált válaszokat élő állaton tanulmányozva jelentős különbségek vannak az állatok faja és az altatás módja szerint.

Végül, az arteriális TRPV1-gyel kapcsolatban a másik fontos kérdés, hogy lehet-e gyógyszer támadáspont? Belegondolva abba a hatalmas erőfeszítésbe, amivel szenzoros neuronokon TRPV1-et gátló molekulákat fejlesztettek teljességgel biztos, hogy a nagyobb gyógyszergyáraknál számos olyan molekula létezik, amelynek vaszkuláris hatásait tesztelve a vaszkuláris TRPV1-ben rejlő potenciál kiaknázható lenne. Ilyen fontos terület lehet az, amikor a vérnyomás emelése szükséges. Ezen esetekben a TRPV1 stimuláció még a katekolaminok hatástalansága esetében is eredményre vezethetne, tekintettel arra, hogy a TRPV1 stimuláció közvetlen Ca^{2+} beáramláshoz vezet mindenféle sejten belüli jelátvivő útvonal aktivációja nélkül. Hitem szerint a vaszkuláris TRPV1 ebben a tekintetben egy fontos gyógyszer-célpont lehet.

5. Publikációk, szabadalmi beadvány

5.1. Szabadalmi beadvány

Szabadalmi beadvány: P1200299 alapszámú magyar szabadalmi bejelentés „Dilution based

5.2. Az értekezésben felhasznált saját közlemények

5.2.1. Az értekezést megalapozó összefoglaló közlemény

Tóth, Attila, Blumberg, Peter M, Boczán, Judit, 2009. Anandamide and the vanilloid receptor (TRPV1). *Vitamins and hormones*, 81, 389–419.

5.2.2. Az értekezést megalapozó eredeti közlemények

- Choi, Hyun-Kyung, Choi, Sun, Lee, Yoonji, Kang, Dong Wook, Ryu, HyungChul, Maeng, Han-Joo, Chung, Suk-Jae, Pavlyukovets, Vladimir A, Pearce, Larry V, **Tóth, Attila**, Tran, Richard, Wang, Yun, Morgan, Matthew A, Blumberg, Peter M, Lee, Jeewoo, 2009. Non-vanillyl resiniferatoxin analogues as potent and metabolically stable transient receptor potential vanilloid 1 agonists. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(2), 690–8.
- Chung, Jae-Uk, Kim, Su Yeon, Lim, Ju-Ok, Choi, Hyun-Kyung, Kang, Sang-Uk, Yoon, Hae-Seok, Ryu, Hyungchul, Kang, Dong Wook, Lee, Jeewoo, Kang, Bomi, Choi, Sun, **Tóth, Attila**, Pearce, Larry V, Pavlyukovets, Vladimir A, Lundberg, Daniel J, Blumberg, Peter M, 2007. Alpha-substituted N-(4-tert-butylbenzyl)-N'-[4-(methylsulfonylamino)benzyl]thiourea analogues as potent and stereospecific TRPV1 antagonists. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15(18), 6043–53.
- Czikora, Ágnes, Lizanecz, Erzsébet, Bakó, Péter, Rutkai, Ibolya, Ruzsnavszky, Ferenc, Magyar, János, Pórszász, Róbert, Kark, Tamás, Facskó, Andrea, Papp, Zoltán, Edes, István, **Tóth, Attila**, 2012. Structure-activity relationships of vanilloid receptor agonists for arteriolar TRPV1. *British journal of pharmacology*, 165(6), 1801–12.
- Czikora, Ágnes, Lizanecz, Erzsébet, Boczán, Judit, Daragó, Andrea, Papp, Zoltán, Édes, István, **Tóth, Attila**, 2012. Vascular metabolism of anandamide to arachidonic acid affects myogenic constriction in response to intraluminal pressure elevation. *Life sciences*, 90(11-12), 407–15.
- Gavva, Narendra R, Klionsky, Lana, Qu, Yusheng, Shi, Licheng, Tamir, Rami, Edenson, Steve, Zhang, TJ, Viswanadhan, Vellarkad N, **Tóth, Attila**, Pearce, Larry V, Vanderah, Todd W, Porreca, Frank, Blumberg, Peter M, Lile, Jack, Sun, Yax, Wild, Ken, Louis, Jean-Claude, Treanor, James JS, 2004. Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. *The Journal of biological chemistry*, 279(19), 20283–95.
- Kark, Tamás, Bagi, Zsolt, Lizanecz, Erzsébet, Pásztor, Eniko T, Erdei, Nóra, Czikora, Ágnes, Papp, Zoltán, Edes, István, Pórszász, Róbert, **Tóth, Attila**, 2008. Tissue-specific regulation of microvascular diameter: opposite functional roles of neuronal and smooth muscle located vanilloid receptor-1. *Molecular pharmacology*, 73(5), 1405–12.
- Lazar, Jozsef, Braun, Derek C, **Tóth, Attila**, Wang, Yun, Pearce, Larry V, Pavlyukovets, Vladimir A, Blumberg, Peter M, Garfield, Susan H, Wincovitch, Stephen, Choi, Hyun-Kyung, Lee, Jeewoo, 2006. Kinetics of penetration influence the apparent potency of vanilloids on TRPV1. *Molecular pharmacology*, 69(4), 1166–73.
- Lee, Jeewoo, Jin, Mi-Kyoung, Kang, Sang-Uk, Kim, Su Yeon, Lee, Jiyoung, Shin, Myoungyoun, Hwang, Jaemin, Cho, Sookhyun, Choi, Yeon-Sil, Choi, Hyun-Kyung, Kim, Sung-Eun, Suh, Young-Ger, Lee, Yong-Sil, Kim, Young-Ho, Ha, Hee-Jin, **Tóth, Attila**, Pearce, Larry V, Tran, Richard, Szabo, Tamas, et al., 2005. Analysis of structure-activity relationships for the “B-region” of N-(4-tert-butylbenzyl)-N'-[4-(methylsulfonylamino)benzyl]thiourea analogues as TRPV1 antagonists. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 15(18), 4143–50.
- Lee, Jeewoo, Kang, Sang-Uk, Choi, Hyun-Kyung, Lee, Jiyoung, Lim, Ju-Ok, Kil, Min-Jung, Jin, Mi-Kyung, Kim, Kang-

- Pil, Sung, Jong-Hyuk, Chung, Suk-Jae, Ha, Hee-Jin, Kim, Young-Ho, Pearce, Larry V, Tran, Richard, Lundberg, Daniel J, Wang, Yun, **Tóth, Attila**, Blumberg, Peter M, 2004. Analysis of structure-activity relationships for the “B-region” of N-(3-acyloxy-2-benzylpropyl)-N’-[4-(methylsulfonylamino)benzyl]thiourea analogues as vanilloid receptor antagonists: discovery of an N-hydroxythiourea analogue with potent analgesic acti. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 14(9), 2291–7.
- Lee, Jeewoo, Kang, Sang-Uk, Kil, Min-Jung, Shin, Myoungyoun, Lim, Ju-Ok, Choi, Hyun-Kyung, Jin, Mi-Kyoung, Kim, Su Yeon, Kim, Sung-Eun, Lee, Yong-Sil, Min, Kyung-Hoon, Kim, Young-Ho, Ha, Hee-Jin, Tran, Richard, Welter, Jacqueline D, Wang, Yun, Szabo, Tamas, Pearce, Larry V, Lundberg, Daniel J, **Tóth, Attila**, et al., 2005. Analysis of structure-activity relationships for the “A-region” of N-(4-t-butylbenzyl)-N’-[4-(methylsulfonylamino)benzyl]thiourea analogues as TRPV1 antagonists. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 15(18), 4136–42.
- Lee, Jeewoo, Kang, Sang-Uk, Lim, Ju-Ok, Choi, Hyun-Kyung, Jin, Mi-kyung, **Tóth, Attila**, Pearce, Larry V, Tran, Richard, Wang, Yun, Szabo, Tamas, Blumberg, Peter M, 2004. N-[4-(methylsulfonylamino)benzyl]thiourea analogues as vanilloid receptor antagonists: analysis of structure-activity relationships for the “C-Region”. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 12(2), 371–85.
- Lee, Jeewoo, Kim, Su Yeon, Lee, Jiyou, Kang, Myungsim, Kil, Min-Jung, Choi, Hyun-Kyung, Jin, Mi-Kyung, Wang, Yun, **Tóth, Attila**, Pearce, Larry V, Lundberg, Daniel J, Tran, Richard, Blumberg, Peter M, 2004. Analysis of structure-activity relationships with the N-(3-acyloxy-2-benzylpropyl)-N’-[4-(methylsulfonylamino)benzyl]thiourea template for vanilloid receptor 1 antagonism. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 12(13), 3411–20.
- Lee, Jeewoo, Kim, Su Yeon, Park, Soyoung, Lim, Ju-Ok, Kim, Ji-Min, Kang, Myungshim, Lee, Jiyou, Kang, Sang-Uk, Choi, Hyun-Kyung, Jin, Mi-Kyung, Welter, Jacqueline D, Szabo, Tamas, Tran, Richard, Pearce, Larry V, **Tóth, Attila**, Blumberg, Peter M, 2004. Structure-activity relationships of simplified resiniferatoxin analogues with potent VR1 agonism elucidates an active conformation of RTX for VR1 binding. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 12(5), 1055–69.
- Lee, Jeewoo, Lee, Jiyou, Kang, Myungshim, Shin, Myoungyoun, Kim, Ji-Min, Kang, Sang-Uk, Lim, Ju-Ok, Choi, Hyun-Kyung, Suh, Young-Ger, Park, Hyeung-Geun, Oh, Uhtaek, Kim, Hee-Doo, Park, Young-Ho, Ha, Hee-Jin, Kim, Young-Ho, **Tóth, Attila**, Wang, Yun, Tran, Richard, Pearce, Larry V, et al., 2003. N-(3-acyloxy-2-benzylpropyl)-N’-[4-(methylsulfonylamino)benzyl]thiourea analogues: novel potent and high affinity antagonists and partial antagonists of the vanilloid receptor. *Journal of medicinal chemistry*, 46(14), 3116–26.
- Lim, Ju-Ok, Jin, Mi-Kyoung, Ryu, HyungChul, Kang, Dong Wook, Lee, Jeewoo, Pearce, Larry V, Tran, Richard, **Tóth, Attila**, Blumberg, Peter M, 2009. Conformationally constrained analogues of N’-(4-tert-butylbenzyl)-N-(4-methylsulfonylamino)benzylthiourea as TRPV1 antagonists. *European journal of medicinal chemistry*, 44(1), 322–31.
- Lizanecz, Erzsébet, Bagi, Zsolt, Pásztor, Eniko T, Papp, Zoltán, Edes, István, Kedei, Noémi, Blumberg, Peter M, **Tóth, Attila**, 2006. Phosphorylation-dependent desensitization by anandamide of vanilloid receptor-1 (TRPV1) function in rat skeletal muscle arterioles and in Chinese hamster ovary cells expressing TRPV1. *Molecular pharmacology*, 69(3), 1015–23.
- Pearce, Larry V, **Tóth, Attila**, Ryu, HyungChul, Kang, Dong Wook, Choi, Hyun-Kyung, Jin, Mi-Kyoung, Lee, Jeewoo, Blumberg, Peter M, 2008. Differential modulation of agonist and antagonist structure activity relations for rat TRPV1 by cyclosporin A and other protein phosphatase inhibitors. *Naunyn-Schmiedeberg’s archives of pharmacology*, 377(2), 149–57.
- Ryu, HyungChul, Jin, Mi-Kyoung, Kim, Su Yeon, Choi, Hyun-Kyung, Kang, Sang-Uk, Kang, Dong Wook, Lee, Jeewoo, Pearce, Larry V, Pavlyukovets, Vladimir A, Morgan, Matthew A, Tran, Richard, **Tóth, Attila**, Lundberg, Daniel J, Blumberg, Peter M, 2008. Stereospecific high-affinity TRPV1 antagonists: chiral N-(2-benzyl-3-pivaloyloxypropyl) 2-[4-(methylsulfonylamino)phenyl]propionamide analogues. *Journal of medicinal chemistry*, 51(1), 57–67.
- Sun, Wei, Liu, Keliang, Ryu, HyungChul, Kang, Dong Wook, Kim, Yong Soo, Kim, Myeong Seop, Cho, Yongsung, Bhondwe, Rahul S, Thorat, Shivaji A, Kim, Ho Shin, Pearce, Larry V, Pavlyukovets, Vladimir A, Tran, Richard, Morgan, Matthew A, Lazar, Jozsef, Ryder, Christopher B, **Tóth, Attila**, Blumberg, Peter M, Lee, Jeewoo, 2012. 2-(4-Methylsulfonylamino)phenyl propanamide TRPV1 antagonists: Structure-activity relationships in the B and C-regions. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20(3), 1310–8.
- Tóth, Attila**, Blumberg, Peter M, Chen, Zili, Kozikowski, Alan P, 2004. Design of a high-affinity competitive antagonist of the vanilloid receptor selective for the calcium entry-linked receptor population. *Molecular*

pharmacology, 65(2), 282–91.

Tóth, Attila, Kedei, Noémi, Szabó, Tamás, Wang, Yun, Blumberg, Peter M, 2002. Thapsigargin binds to and inhibits the cloned vanilloid receptor-1. *Biochemical and biophysical research communications*, 293(2), 777–82.

Tóth, Attila, Kedei, Noémi, Wang, Yun, Blumberg, Peter M, 2003. Arachidonyl dopamine as a ligand for the vanilloid receptor VR1 of the rat. *Life sciences*, 73(4), 487–98.

Tóth, Attila, Wang, Yun, Kedei, Noémi, Tran, Richard, Pearce, Larry V, Kang, Sang-Uk, Jin, Mi-Kyung, Choi, Hyun-Kyung, Lee, Jeewoo, Blumberg, Peter M, 2005. Different vanilloid agonists cause different patterns of calcium response in CHO cells heterologously expressing rat TRPV1. *Life sciences*, 76(25), 2921–32.

Wang, Yun, Szabo, Tamas, Welter, Jacqueline D, **Tóth, Attila**, Tran, Richard, Lee, Jiyouon, Kang, Sang Uk, Suh, Young-Ger, Blumberg, Peter M, Lee, Jeewoo, 2002. High affinity antagonists of the vanilloid receptor. *Molecular pharmacology*, 62(4), 947–56.

Wang, Yun, **Tóth, Attila**, Tran, Richard, Szabo, Tamas, Welter, Jacqueline D, Blumberg, Peter M, Lee, Jiyouon, Kang, Sang-Uk, Lim, Ju-Ok, Lee, Jeewoo, 2003. High-affinity partial agonists of the vanilloid receptor. *Molecular pharmacology*, 64(2), 325–33.

Az értekezésben felhasznált közlemények impakt faktora: **91,046** (ebből 2,439 az összefoglaló közlemény)

Ezekre kapott FÜGGETLEN hivatkozások száma: **486** (ebből 23 az összefoglaló közleményre)

A felhasznált közlemények közül első-utolsó szerzős közlemények impakt faktora: **31,026** (ebből 2,439 az összefoglaló közlemény)

Ezekre kapott FÜGGETLEN hivatkozások száma: **159** (ebből 23 az összefoglaló közleményre).

5.3. Az értekezéshez szorosan nem kötődő egyéb eredeti közlemények

Bagi, Z, Erdei, N, Toth, A, Li, W, Hintze T H, Koller, A, Kaley, G, 2005. Type 2 diabetic mice have increased arteriolar tone and blood pressure. Enhanced release of COX-2 derived constrictor prostaglandins. *Arteriosclerosis thrombosis and vascular biology*, 25(8), 1610–1616.

Barta, J, Toth, A, Edes, I, Vaszily, M, Papp Jgy, Varro, A, Papp, Z, 2005. Calpain-1-sensitive myofibrillar proteins of the human myocardium. *Molecular and cellular biochemistry*, 278(1-2), 1–8.

Barta, J, Toth, A, Jaquet, K, Redlich, A, Edes, I, Papp, Z, 2003. Calpain-1-dependent degradation of troponin I mutants found in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Molecular and cellular biochemistry*, 251(1-2), 83–88.

Borbely, A, Toth, A, Edes, I, Virag, L, Papp Jgy, Varro, A, Paulus W J, van Der Velden J, Stienen G J M, Papp, Z, 2005. Peroxynitrite-induced alpha-actinin nitration and contractile alterations in isolated human myocardial cells. *Cardiovascular research*, 67(2), 225–233.

Brodie, C, Steinhart, R, Kazimirsky, G, Rubinfeld, H, Hyman, T, Ayres J N, Hur G M, Toth, A, Yang D Z, Garfield S H, Stone J C, Blumberg P M, 2004. PKC delta associates with and is involved in the phosphorylation of RasGRP3 in response to phorbol esters. *Molecular pharmacology*, 66(1), 76–84.

Czuriga, D, Toth, A, Pasztor E T, Balogh, A, Bodnar, A, Nizsaloczki, E, Lionetti, V, Recchia F A, Czuriga, I, Edes, I, Papp, Z, 2012. Cell-to-cell variability in troponin I phosphorylation in a porcine model of pacing-induced heart failure. *Basic research in cardiology*, 107(2).

Darago, A, Fagyas, M, Siket I M, Facsko, A, Megyesi, Z, Kalasz, J, Galajda, Z, Szerafin, T, Harsfalvi, J, Edes, I, Papp, Z, Toth, A, Szentmiklosi, J, 2012. Differences in Angiotensin Convertase Enzyme (ACE) Activity and Expression May Contribute to Shorter Event Free Period After Coronary Artery Bypass Graft Surgery. *Cardiovascular*

therapeutics, 30(3), 136–144.

- Erdei, N, Toth, A, Pasztor E T, Papp, Z, Edes, I, Koller, A, Bagi, Z, 2006. High-fat diet-induced reduction in nitric oxide-dependent arteriolar dilation in rats: role of xanthine oxidase-derived superoxide anion. *American journal of physiology-heart and circulatory physiology*, 291(5), H2107–H2115.
- F, Edes I, Toth, A, Csanyi, G, Lomnicka, M, Chlopicki, S, Edes, I, Papp, Z, 2008. Late-stage alterations in myofibrillar contractile function in a transgenic mouse model of dilated cardiomyopathy (Tgalphaq*44). *Journal of molecular and cellular cardiology*, 45(3), 363–372.
- Fedor, R, Asztalos, L, Locsey, L, Szabo, L, Manyine I S, Fagyas, M, Lizanecz, E, Toth, A, 2011. Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme predicts left ventricular hypertrophy after renal transplantation. *Transplantation proceedings*, 43(4), 1259–1260.
- Fedor, R, Asztalos, L, Lőcsey, L, Szabó, L, Mányiné I S, Fagyas, M, Lizanecz, E, Tóth, A, 2010. Insertion/Deletion Polymorphism of Angiotensin-Converting Enzyme as a Risk Factor for Chronic Allograft Nephropathy. *Transplantation proceedings*, 42(6), 2304–2308.
- Fuerjes, G, Toth, GK, Peitl, B, Porszasz, R, Lelesz, B, Sari, R, Toth, A, Szilvassy, Z, Nemeth, J, 2012. Thrithene radioimmunoassay: description and application of a novel method. *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry*, 292(1), 113–118.
- Hegedus, E, Imre, L, Pataki, J, Lizanecz, E, Szekvolgyi, L, Fazakas, F, Bacso, Z, Toth, A, Szabo, M, Seres, Z, Szabo, G, 2008. Heteroduplex analysis using flow cytometric microbead assays to detect deletions, insertions, and single-strand lesions. *Cytometry part A*, 73A(3), 238–245.
- Hertelendi, Z, Toth, A, Borbely, A, Galajda, Z, van der Velden J, Stienen G J M, Édes, I, Papp, Z, 2008. Oxidation of myofilament protein sulfhydryl groups reduces the contractile force and its Ca²⁺ sensitivity in human cardiomyocytes. *Antioxidants and redox signaling*, 10(7), 1175–1184.
- Hertelendi, Z, Tóth, A, Borbély, A, Galajda, Z, Edes, I, Tósaki, A, Papp, Z, 2009. The peroxynitrite evoked contractile depression can be partially reversed by antioxidants in human cardiomyocytes. *Journal of cellular and molecular medicine*, 13(8b), 2200–2209.
- Kedei, N, Lundberg D J, Toth, A, Welburn, P, Garfield S H, Blumberg P M, 2004. Characterization of the interaction of ingenol 3-angelate with protein kinase C. *Cancer research*, 64(9), 3243–3255.
- Kolozsvári, B, Bako, E, Becsi, B, Kiss, A, Czikora, A, Toth, A, Vamosi, G, Gergely, P, Erdodi, F, 2012. Calcineurin regulates endothelial barrier function by interaction with and dephosphorylation of myosin phosphatase. *Cardiovascular research*, 96(3), 494–503.
- Lizanecz, E, Pasztor E T, Mohacsi, A, Papp, Z, Edes, I, Toth, A, 2006. Mistyping angiotensinogen M235T alleles. *Hypertension research*, 29(3), 197–201.
- M*, Szántó, I*, Rutkai, Cs, Hegedűs, Czikora, Á, Rózsahegyí, M, Kiss, B, Virág, L, Gergely, P, Tóth, A, Bai, P, 2011. Poly(ADP-ribose) polymerase-2 depletion reduces doxorubicin-induced damage through SIRT1 induction. *Cardiovascular research*, 92(3), 430–438.
- Molnar, A, Borbely, A, Czuriga, D, Ivetta S M, Szilagyi, S, Hertelendi, Z, Pasztor E T, Balogh, A, Galajda, Z, Szerafin, T, Jaquet, K, Papp, Z, Edes, I, Toth, A, 2009. Protein kinase C contributes to the maintenance of contractile force in human ventricular cardiomyocytes. *Journal of biological chemistry*, 284(2), 1031–1039.
- Molnár, A, Tóth, A, Bagi, Z, Papp, Z, Édes, I, Vaszily, M, Galajda, Z, Papp Jgy, Varró, A, Szűts, V, Lacza, Z, Gerő, D, Szabó, C, 2006. Activation of the poly(ADP-ribose) polymerase pathway in human heart failure. *Molecular medicine*, 12(7-8), 143–152.
- Toth, A, Boczan, J, Kedei, N, Lizanecz, E, Bagi, Z, Papp, Z, Edes, I, Csiba, L, Blumberg, PM, 2005. Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Molecular brain research*, 135(1-2), 162–168.
- Toth, A, Kiss, E, Gergely, P, Walsh M P, Hartshorne D J, Erdodi, F, 2000. Phosphorylation of MYPT1 by protein kinase C attenuates interaction with PP1 catalytic subunit and the 20 kDa light chain of myosin. *FEBS LETTERS*, 484(2), 113–117.
- Toth, A, Kiss, E, Herberg F W, Gergely, P, Hartshorne D J, Erdodi, F, 2000. Study of the subunit interactions in myosin phosphatase by surface plasmon resonance. *European journal of biochemistry*, 267(6), 1687–1697.
- Wang, Y, Kedei, N, Wang, M, Wang Q J, Huppler A R, Toth, A, Tran, R, Blumberg P M, 2004. Interaction between protein kinase C mu and the vanilloid receptor type 1. *Journal of biological chemistry*, 279(51), 53674–53682.

Y, Ait Mou, Toth, A, Cassan, C, Czuriga, D, P, de Tombe P, Papp, Z, Lacampagne, A, Cazorla, O, 2011. Beneficial effects of SR33805 in failing myocardium. *Cardiovascular research*, 91(3), 412–419.

Az értekezéshez szorosan NEM kötődő egyéb közlemények impakt faktora: **108,861**

Erre kapott összes FÜGGETLEN hivatkozások száma: **505**

Az értekezéshez szorosan NEM kötődő egyéb közlemények közül első-utolsó szerzős közlemények impakt faktora: **18,380**

Ezekre kapott FÜGGETLEN hivatkozások száma: **198**.

5.4. Összefoglaló scientometriai adatok

Közlemény típusok	Szám		Hivatkozások	
	Összesen	e	Független	Összes
I. Tudományos folyóiratcikk	52	---	---	---
teljes cikk, nemzetközi folyóiratban	---	52	991	1253
teljes cikk, hazai idegen nyelvű folyóiratban	---	0	0	0
teljes cikk, hazai magyar nyelvű folyóiratban	---	0	0	0
teljes cikk, rövid közleményként	---	0	0	0
II. Könyvek	0	---	---	---
a) Szakkönyv	0	---	---	---
Szakkönyv, kézikönyv, idegen nyelvű	---	0	0	0
Szakkönyv, kézikönyv, magyar nyelvű	---	0	0	0
Tankönyv	---	0	0	0
b) Szerkesztett könyv	0	---	---	---
Szerkesztett könyv, idegen nyelvű	---	0	---	---
Szerkesztett könyv, magyar nyelvű	---	0	---	---
Szerkesztett tankönyv	---	0	---	---
III. Könyvfejezet	0	---	---	---
Könyvfejezet, idegen nyelvű	---	0	0	0
Könyvfejezet, magyar nyelvű	---	0	0	0
Tankönyvekbe írt fejezetek	---	0	0	0
IV. Proceedings*	0	---	0	0
Tudományos közlemények összesen (I-IV.)	52	---	991	1253

Speciális tudományometriai adatok	
	Adat
Első szerzős folyóiratcikkek száma (az összes %-ban)	8 (15,38%)
Utolsó szerzős tudományos cikkek száma (az összes %-ban)	8 (15,38%)
Első és utolsó szerzőségű folyóiratcikkek impakt faktora	49,406
Az utolsó tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2002 -) tudományos folyóiratcikkek összegzett impakt faktora és száma (zárójelben)	193,615 (50)
Az utolsó tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2002 -) tudományos folyóiratcikkek összegzett impakt faktora az összes %-ban	96,85%
Magyar nyelven megjelent tudományos teljes folyóiratcikkek száma	0
Az utolsó 10 év (2003-2013) tudományos teljes, lektorált folyóiratcikkeinek száma	48
összesített impakt faktora	185,200
független hivatkozások száma	874
Folyóiratcikkek, 15-nél több szerzővel	8

V. Egyéb tudományos	0	---	---	---
Egyéb tudományos művek, ideértve a nem teljes folyóiratcikkek és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkek is	---	0	0	0
Szerkesztési levezetés, hozzászólások, válaszok	---	0	0	0
VI. Absztrakt	0	---	0	0

Összesített impakt faktor	199,907	---	---	---
Idézettség száma	---	---	991	1253
Hirsch index	21	---	---	---

6. Köszönetnyilvánítás

Hosszú út vezetett ezen értekezés megírásáig. Sokaknak volt szerepe eddigi pályafutásomban. A kezdeteket nézve aligha jutottam volna el a felsőoktatásba olyan nagyszerű tanárok nélkül, mint **Dr. Tóth Albert** (Berci bá', Kisújszállás, Móricz Zsigmond Gimnázium) és **Tóth Imre** (Karcag, Szentannai Sámuel Mezőgazdasági Szakközépiskola). Máig meghatározzák életemet, világnézetemet. Az egyetemi évek alatt nagyon hamar bekapcsolódtam a tudományos diákkörbe, először a Debreceni Egyetem Élettani Intézetében, majd az Orvosi Vegytani Intézetében. Ez utóbbi helyen **Dr. Erdődi Ferenc** mentorsága mellett PhD fokozatig jutottam. Az Orvosi Vegytani Intézetben olyan személyekkel sikerült együtt dolgoznom, akik tudományos szemléletem formálásához nagyban hozzájárultak: **Dr. Gergely Pál, Dr. Dombrádi Viktor, Dr. Csontos Csilla, Dr. Bai Péter**. És mindez nem lett volna elég **Dr. Németh Árpádné Köstner Ágnes** segítségével és humora nélkül.

Posztdoktori éveim során az USA-ban **Peter M. Blumberg** laboratóriumában dolgozhattam. Peter nagyszerű mentor és ember, akinek rengeteget köszönhetek. Megtanította a farmakológia eszköztárát és szemléletet adott a tudományban való eligazodásra. Ahogy mondani szokta: aki egyszer tagja a laborának, az mindig az...

Hazatérve az a lehetőség várt, hogy a **Dr. Édes István** vezette Kardiológiai Klinikán **Dr. Papp Zoltán** tanszékén saját laboratóriumot alapíthattam. Eleinte félelmetes volt a klinikai légkörbe alapkutatóként bemerészkedni, de aztán kiderült, hogy ennél jobb lehetőséget nem is kaphattam volna. Kivételes munkakörülményeket és a klinikáról érkező segítséget abban, hogy próbáljuk a laboratóriumot a betegágy segítségére használni.

A Klinikai Fiziológiai Tanszéken nemcsak labort alapíthattam, de világszínvonalú kutatók lettek a barátaim és segítőim, mentoraim: **Dr. Papp Zoltán** és **Dr. Bagi Zsolt**. Nehezen hihető volt számomra is, de a hazai színvonal nem maradt el az NIH-től. Legfeljebb az elérhető folyóiratokban.

A labor alapítás nem könnyű, segítséget kaptam **Pásztorné Tóth Enikőtől** és **Mányiné Siket Ivettától**, akikre a mindennapokban támaszkodhattam. Az új labor nem lett volna sikeres olyan hallgatók nélkül, mint a jelen munkában említettek közül **Dr. Lizanecz Erzsébet** és **Dr. Czikora Ágnes**, illetve **Dr. Fagyas Miklós**. Megtiszteltetés, hogy ilyen embereknek nyújthattam segítséget a tudományos munkájuk kezdetén. A kapszaicin receptor *in vivo* élettani funkcióját és az állatok működését **Dr. Pórszász Róberttől** tanulom.

Nem szeretnék elfeledkezni olyanokról, akikkel ugyan sokkal kevesebbet volt módom beszélni, mint szerettem volna, de példaképként tekintek rájuk és saját érzéseim szerint sokat tettek azért, hogy itthon folytatom a kutatásokat: **Dr. Koller Ákos** és **Dr. Szolcsányi János**.

Minden tudományos érdeklődés, tanács és lehetőség kevés lett volna családom nélkül. Édesanyám, **Jónás Karolina** és elhunyt édesapám **Tóth István** felneveltek, támogattak. Feleségemnek, **Dr. Boczán Juditnak** nemcsak gyermekeimet, **Mátét** és **Zsófiát** köszönhetem, hanem jószerével mindent, ami érték körülöttem emberileg és tudományosan egyaránt. Anyósomban, **Dr. Boczán Gáborné Sámi Erikában** családi és lelki támaszt találtam.

Végül, szeretnék köszönetet mondani kutatásaim anyagi támogatóinak is: OTKA: K 68077, K84300; ETT: 430/2006, 377/2009, TÁMOP 4.2.1./B-09/1/KONV-2010-0007, TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024, TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045, REG-EA-09-1-2009-0013, MSD Magyarország Kft, Richter Gedeon Nyrt, Pfizer Magyarország Kft.