

dc_652_12

MTA Doktori Értekezés

A kapszaicin receptor (TRPV1) farmakológiája és keringésélettani szerepe

Tóth Attila

Debrecen, 2013

dc_652_12
MTA Doktori Értekezés

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

• A fontosabb rövidítések jegyzéke.....	5
• 1. Bevezetés.....	6
1.1. Szakmai indíttatás.....	6
1.1. A kapszaicin.....	7
1.2. A kapszaicin receptor.....	7
1.3. A klónozott TRPV1.....	9
1.3.1. A TRPV1 szerkezete.....	9
1.3.2. A TRPV1 permeabilitásának alapjai.....	10
1.3.3. A TRPV1 poszttranszlációs szabályozásban fontos régiói.....	12
1.4. A TRPV1 élettani jelentősége.....	13
1.4.1. A TRPV1 szenzoros neuronális szerepe.....	13
1.4.2. A TRPV1 aktiválásának módjai.....	15
1.4.3. A TRPV1 vaszkuláris biológiai szerepe.....	17
1.5. A TRPV1 molekuláris farmakológiája.....	17
1.5.1. Kis molekulatömegű természetben előforduló TRPV1 ligandok.....	17
1.5.2. A TRPV1 potenciális endogén ligandjai.....	18
1.5.3. A TRPV1-en ható exogén agonisták fejlesztése.....	21
1.5.4. A TRPV1-en ható exogén antagonisták fejlesztése.....	23
1.5.5. A TRPV1 kapszaicin kötőhelye és egyéb funkcionális régiói.....	28
1.5.6. Iparági áttekintés.....	30
• 2. Módszerek.....	33
2.1. Arteriola izoláció patkány vázizomból és érátmérő meghatározás.....	33
2.2. CHO-TRPV1 sejtek tenyésztése.....	33
2.3. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvételi kísérletek.....	34
2.4. Intracelluláris Ca^{2+} koncentráció becslése.....	35
2.5. Immunhisztokémia.....	36
2.6. $[^3\text{H}]$ -resiniferatoxin (RTX) kötődési kísérletek.....	37
• 3. Eredmények.....	39
3.1. A TRPV1-en ható, természetben előforduló ligandok azonosítása, jellemzése.....	39
3.1.1. A thapsigargin mint egy természetben előforduló TRPV1 antagonistá.....	39
3.1.2. N-arachidonil dopamin (NADA), mint TRPV1 ligand.....	44
3.2. A TRPV1 molekuláris farmakológiája.....	48
3.2.1. Parciális agonisták.....	49
3.2.2. TRPV1 antagonisták: vezérmolekulák és modalitás a hatékonyságban.....	54
3.3.3. Molekulafejlesztés.....	62
3.3. A TRPV1 ligandkötő helyének pozíciója.....	76
3.4. Modalitások a TRPV1 kapszaicin kötő helyén.....	79
3.5. A vaszkuláris TRPV1.....	91
• 4. Az új eredmények összefoglalása.....	114
• 5. Megbeszélés, az eredmények potenciális hasznosítása.....	115
• 6. Irodalomjegyzék.....	131
• 7. Publikációk, szabadalmi beadvány.....	139
7.1. Szabadalmi beadvány.....	139
7.2. Az értekezésben felhasznált saját közlemények.....	139
7.2.1. Az értekezést megalapozó összefoglaló közlemény.....	139
7.2.2. Az értekezést megalapozó eredeti közlemények.....	139

dc_652_12

7.3. Az értekezéshez szorosan nem kötődő egyéb eredeti közlemények.....	142
7.4 Teljes közleménylista.....	145
7.4.1. PhD. fokozat megszerzése előtt.....	145
7.4.2. PhD. fokozat megszerzése után.....	145
7.5. Összefoglaló scientometria adatok.....	154
• 8. Köszönetnyilvánítás.....	156

A fontosabb rövidítések jegyzéke

[³ H]RTX	triciált RTX
5-HT	szerootonin
ATP	Adenozin trifoszfát
BSA	Marha szérumalbumin
CaM	kalcium-kalmodulin
CaM kináz II	kalcium kalmodulin függő protein kináz
CGRP	Kalcitonin gén hasonló peptid (Calcitonin gene-related peptide)
CHO	Kínai törpehörcsög ovárium (Chinese Hamster Ovary) sejtvonal
CHO-TRPV1	TRPV1 expresszáló CHO sejtek
CPZ	capsazepine
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DPBS	Dulbecco -féle foszfárpuffer (Dulbesso's Phosphate Buffer Saline)
DRG	hátsógyöki ganglion
EDTA	etiléndiamin tetraacetát
FAAH	szabad zsírsav amid hidroláz
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etánszulfonsav
HETE	hidroxi-eikoza-tetraénsav
HPETE	hidroperoxi-eikoza-tetraénsav
IBTU	N-(4-klorobenzil)-N-(4-hidroxi-3-jodo-5-metoxibenzil)tiourea
JYL-1421	[N-(4-tercbutilbenzil)-N-[3-fluoro-4-(metilszulfonamido)benzil]-tiourea]
JYL-1511	N-(4-tercbutilbenzil)-N-[3-metoxi-4-(metilszulfonamido)benzil]tiourea
JYL-79	N-[2-(3,4-dimetilbenzil)-3-(pivaloiloxi)propil]-N'-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)tiourea
JYL-827	N-[2-(3,4-dimetilbenzil)-3-(pivaloiloxi)propil]-N-[4-(metilszulfonamido)benzil]tiourea
KJM-429	[N-(4-tercbutilbenzil)-N-[4-(metilszulfonamido)benzil]tiourea]
MSK-195	N-[2-(3,4-dimetilbenzil)-3-(pivaloiloxi)propil]-2-[4-(2-aminoetoxi)-3-metoxifenil]acetamid
NADA	N-archidonil dopamin
NF	neurofilament
OLDA	N-oleoil dopamin
PIP ₂	foszfatidil inozitol 4,5-biszfoszfát
PKA	protein kináz A
PKC	protein kináz C
PMSF	fenilmetánszulfonil fluorid
PPP2B	protein foszfatáz 2B, kalcineurin
RIPA	Radioimmun kicsapási (radioimmune precipitation assay) puffer
RTX	resiniferatoxin
SH	szulfhidril csoport
SMA	simaiizom aktin
SP	P-anyag
SU-200	N-(4-terc-butilbenzil)-N'-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)tiourea
TRPV1	kapszaicin receptor, transient receptor potential V1

1. Bevezetés

1.1. Szakmai indíttatás

Biológusként végeztem 1996-ben a Kossuth Lajos Tudományegyetem első dedikált molekuláris biológiai képzést nyújtó évfolyamában. Ennek az akkor formabontóan új típusú képzésnek alapjait elsősorban *Fésüs László* (Biokémiai Intézet, Debreceni Orvostudományi Egyetem) tette le, a lényege pedig a modern technikákat bemutató, gyakorlatorientált képzés, melynek során a hallgató munkáját egy tutor is segíti. Nekem ezen képzés keretében volt szerencsém már tudományos diákköri hallgatóként csatlakozni **Erdődi Ferenchez** (Orvosi Vegytani Intézet, Debreceni Orvostudományi Egyetem) 1993-ban, aki az első mentorom volt. TDK hallgatóként és később PhD ösztöndíjasként volt szerencsém elmélyülni az enzimológiában, és a poszttranszlációs módosításokkal történő fehérje aktivitás-szabályozás terén.

A kapszaicin receptorral (TRPV1) későbbi mentorom, **Peter M. Blumberg** (National Institutes of Health, Maryland, Bethesda, USA) laboratóriumában ismerkedtem meg. Itt a TRPV1 molekuláris farmakológiájával kapcsolatos kutatásokat folytattunk, melyek egy részét jelen értekezésben is bemutatom. Szerencsére ezidőben a kapszaicin receptor modulációjára irányuló gyógyszergyári kutatások a figyelem homlokterébe kerültek.

Pályafutásomat 2001-től az *Édes István*, a korábban nemzetközileg jelentős biokémikus által vezetett Kardiológiai Intézetben (Debreceni Egyetem) folytattam. A 2003-as hazatérésemet követően itt egy olyan légkörbe kerültem, ahol lehetőségem nyílt egy saját laboratórium felépítésére. Ennek sikerében alapvető szerepe volt utolsó mentoraimnak és egyben barátaimnak: **Papp Zoltánnak** és **Bagi Zsoltnak**.

Az általam vezetett kardiovaszkuláris laboratórium három fontos profillal rendelkezik: vaszkuláris biológia, biokémia és transzlációs kutatások. Jelen értekezésben hazai kutatásaink közül kizárólag a TRPV1-gyel szerzett, vaszkuláris biológiai vonatkozású adatainkra támaszkodok.

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). A csípősség mértékének vizsgálatára Scoville javasolt egy máig élő módszert. Ennek lényege, hogy mekkora mértékben kell a kapszaicint is tartalmazó alkoholos növényi kivonatot meghígítani, hogy a nyelven ne fejtse ki jellegzetes csípősségét (Scoville érték) (Scoville 1912). Ez az érték a Mexikói *habanero* esetében elérheti a 350 000-et is (Naj 1992).

Érdekesség, hogy a köznapi életben a kapszaicin felhasználására a konyhában fűszerként és a rendvédelemben paprika spray-ként gondolnak leggyakrabban. Mindkét felhasználási terület nagy múltra tekint vissza a paprika őshazájának tekintett Amerikában, ahol az inkák a paprikát nem csak fűszerezésre, hanem az elégetett növény füstjét a támadó spanyol hadak elvakítására is használták (Naj 1992).

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 tartalmú növények étrendbeli és gyógyászati felhasználása minden bizonnyal a történelem előtti időkbe nyúlik vissza (Naj 1992). A kapszaicin hatásainak tudományos alapossággal 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). Fontos megjegyezni, hogy 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). Azt is mindenképpen meg kell említeni a jelenség kapcsán, hogy 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, mely a kapszaicin receptor molekuláris farmakológiájának alapjait jelentette. Az első jelentős felismerés az 1975-76-ban Szolcsányi János és Jancsó-Gábor Aranka által publikált struktúra-aktivitás összefüggés vizsgálat volt, amely az akkor elérhető eszközökkel a mai napig pontos megállapításokat tett a kapszaicin receptor ligandok szerkezetére (Szolcsányi, Jancso-Gabor 1975; Szolcsányi, Jancsó-Gábor 1976). Érdekes, hogy a kapszaicin receptor kutatás ezzel a felismeréssel mintha ismét háttérbe szorult volna ahelyett, hogy az új adatok birtokában egy jelentős fejlődés vette volna kezdetét. 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). Talán érdemes megemlíteni, hogy a resiniferatoxint kifejlesztő kutatócsoport eredményei alapján eleinte azt képviselte, hogy a kapszaicin és a resiniferatoxin eltérő molekuláris struktúrákon hatnak (önálló vanilloid receptor) (Szallasi, Blumberg 1999), mely hipotézisről már ugyanabban az évben bebizonyosodott, hogy valótlan (Szallasi et al. 1999; Szallasi et al. 1999).

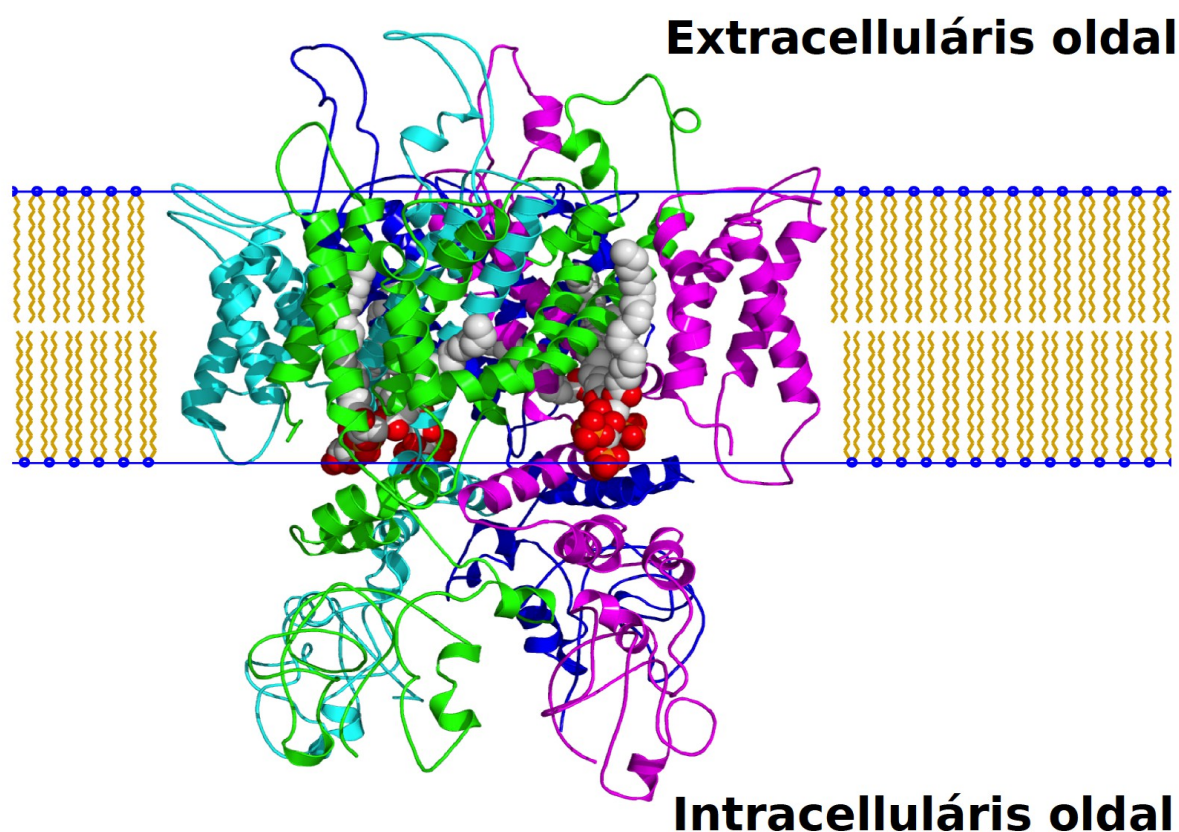
Ekkor komoly korlátja volt a további kutatásoknak, hogy nem álltak rendelkezésre a kapszaicin receptoron ható, kellő szelektivitást mutató antagonisták. Ezek hiányában azonban a kapszaicin receptor élettani szerepének tisztázására csak a korábban Jancsó és Szolcsányi által leírt deszenzibilizáció felhasználásával lehetett limitált adatokat nyerni (az élettani hatások felméréséhez sokszor elengedhetetlen az adott receptor funkciójának kísérlet közben történő felfüggesztése) (Jancsó et al. 1967). Az első valóban jól használható kompetitív antagonistá a capsazepine 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

1.3.1. A TRPV1 szerkezete

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. Az 1. ábra mutatja a TRPV1 szerkezetének modelljét biológiai membránokban (Brauchi et al. 2007) alapján.



1. ábra: A TRPV1 szerkezete a sejtmembránban

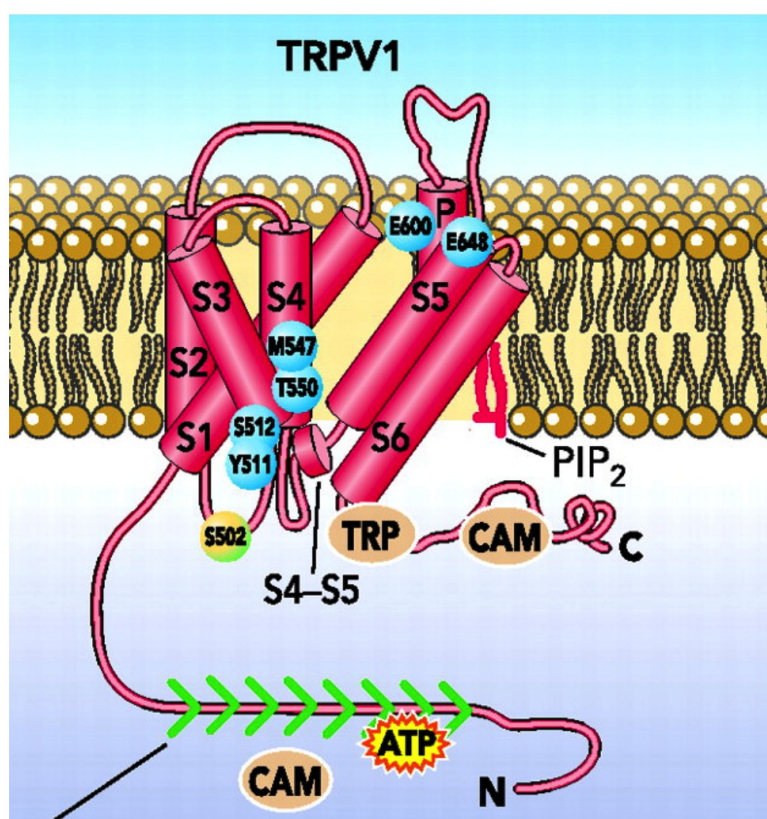
A membránba ágyazott TRPV1 javasolt szerkezete látható a képen. A csatornát a TRPV1 tetramerek alkotják (különböző színekkel jelölve).

Az ábra forrása: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Trpv1_pip2_bilayer.png ahol (Brauchi et al. 2007) alapján készítették.

1.3.2. A TRPV1 permeabilitásának alapjai

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 (2. ábra). Ezt követte a ligandkötésben fontos aminosav oldalláncok azonosítása. A pórusformáló régiótól távolabb, a 3-4. transzmembrán régiókban és az ezeket összekötő hurokrégióban (2. ábra) 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 (2. ábra). Ezek közül behatóan tanulmányozták a kalcium-kalmodulin (CaM) (Numazaki et al. 2003), és a foszfatidil inozitol 4,5-biszfoszfát (PIP₂) kötődését (Prescott, Julius 2003).



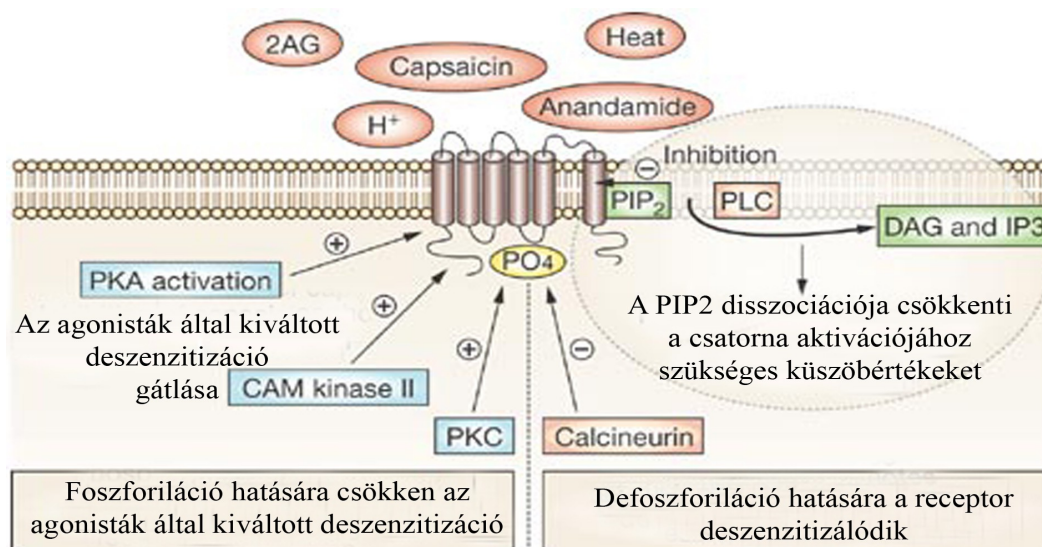
2. ábra: A TRPV1 ligandkötésben fontos régiói

Az ábrán a TRPV1 ligandkötésben, illetve proton felismerésben fontos aminosav oldalláncai vannak jelölve kék körökben. Azon kötőhelyek is feltüntetésre kerültek, amelyek a TRPV1 szabályozásában szerepet játszhatnak (TRP: transient receptor potential motívum, CAM: Ca²⁺-calmodulin kötőhely, PIP₂: foszfatidil inozitol-bisz-foszfát kötőhely, ATP kötőhely). Az S502 pedig egy foszforilációs hely, amelynek a receptor regulációjában fontos szerepet tulajdonítanak. Az ábra (Bessac, Jordt 2008) alapján (Figure 1) készült.

1.3.3. A TRPV1 poszttranszlációs szabályozásban fontos régiói

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 kalmódulin függő protein kináz II (CaM kináz II) szerepének feltárása (Jung et al. 2004). A 3. ábrán TRPV1 aktivitás szabályozásának legfontosabb elemeit tüntettem fel (3. ábra). A TRPV1 aktivációja során a megemelkedő intracelluláris Ca^{2+} ion koncentráció a receptor calcineurin általi defoszforilációjához vezet. A defoszforilált állapotban lévő receptor ismételt agonista hatásokra sokkal kisebb mértékben aktiválódik (tachyphylaxis). A TRPV1 aktiválásához szükséges minimális stimulus PIP_2 kötés által szabályozódik, továbbá számos kináz (például PKA, PKC és CaM kináz II) is képes a defoszforiláció mértékét befolyásolni.

Összességében megállapíthatóvá vált, hogy a TRPV1 agonisták általi aktivációja a csatornán beáramló Ca^{2+} ionok révén aktiválja a calcineurint, mely foszfatáz a kellő mértékű kináz aktivitások hiányában képes a TRPV1-et defoszforilálni és így a receptort a további agonista stimulusokkal szemben deszenzibilizálni (3. ábra).



3. ábra: A TRPV1 szabályozása foszforylációval

A TRPV1 foszforylációs állapotát számos intracelluláris jelátviteli útvonal szabályozhatja. Legnagyobb szerepet a protein kináz A (PKA), Kalcium kalmodulin függő kináz II (CAM kinase II) és a protein kináz C-nek (PKC) tulajdonítanak. A TRPV1 negatív regulátorai közül a calcineurin és a foszfatidil inozitol 4,5-biszfoszfát (PIP₂) került említésre. Az ábra (Bingham et al. 2009) alapján (Figure 4) készült.

1.4. A TRPV1 élettani jelentősége

1.4.1. A TRPV1 szenzoros neuronális szerepe

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, Jancso-Gabor 1975).

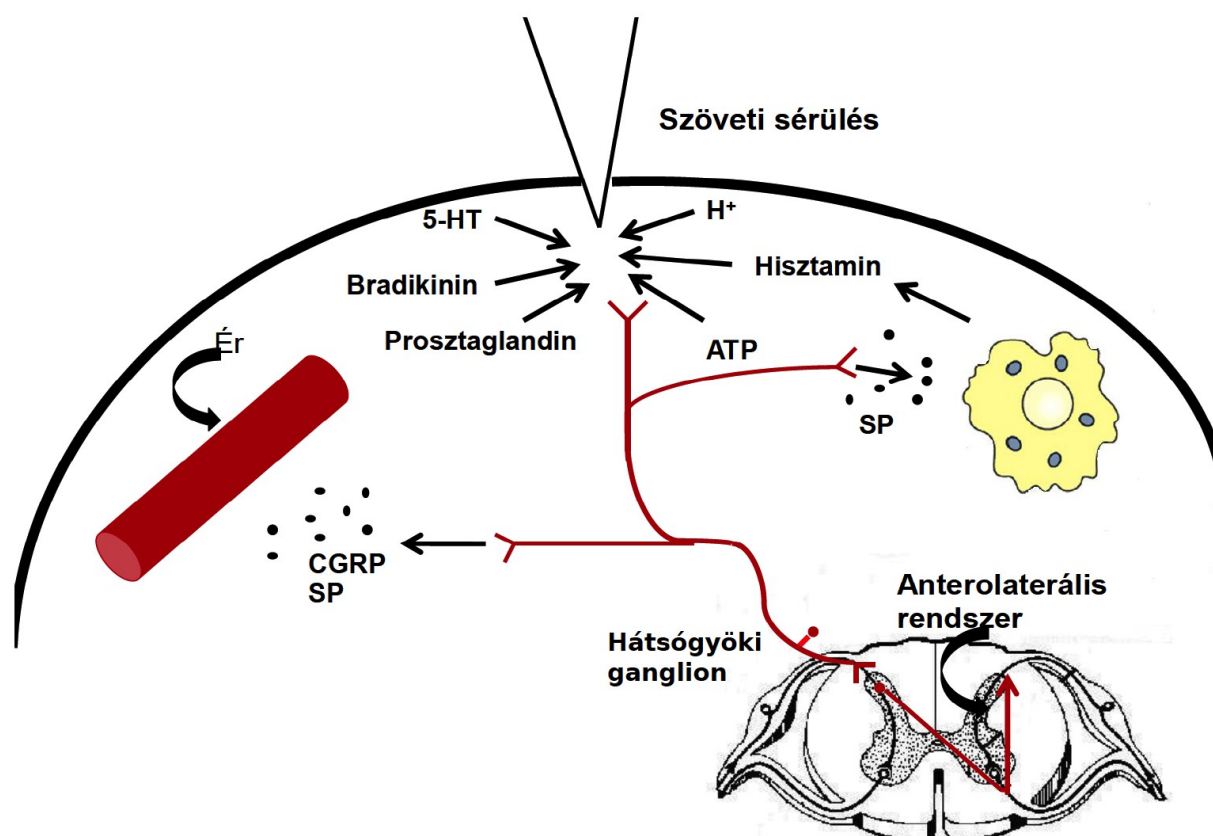
A TRPV1 élettani tulajdonságainak feltárása nagy lendületet vett a receptor klónozását követően (Caterina et al. 1997), amikor lehetővé vált a receptor tulajdonságainak részletes és szelektív vizsgálata. Ezt elsősorban a receptor klónozását végző David Julius laboratóriumában végezték eleinte. A klónozást 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 Solcsányi által megfigyelt plazmaextravazációt a szenzoros neuronokból kiszabaduló P-anyag közvetítette, amely a plazmaextravazáció mellett antidrom vazodilatációt is kiváltott (Lembeck, Holzer 1979).

Elsősorban Solcsányi 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 (4. ábra). Fontos, hogy ezen folyamatban az akciós potenciál tovahaladását gátló anyagok, mint a lidokain, a TRPV1 stimulációt követő fájdalomérzet kialakulását gátolni képesek (Solcsányi et al. 1988). A második funkció a lokális efferens hatás. Ennek során a szenzoros neuronokba áramló Ca²⁺ 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 (4. ábra). Végül, a TRPV1 stimulációt követően olyan szisztémás hatással rendelkező neuropeptidek is felszabadulhatnak, amelyek szisztémás efferens hatások kialakulásához is vezethetnek. Ezen potenciális neuropeptidek közül talán a szomatosztatin szerepét tárták fel leghamarabb (Szolcsányi et al. 1998; Szolcsányi et al. 1998).



4. ábra: A TRPV1 stimuláció hatására bekövetkező szenzoros neuron mediált hatások

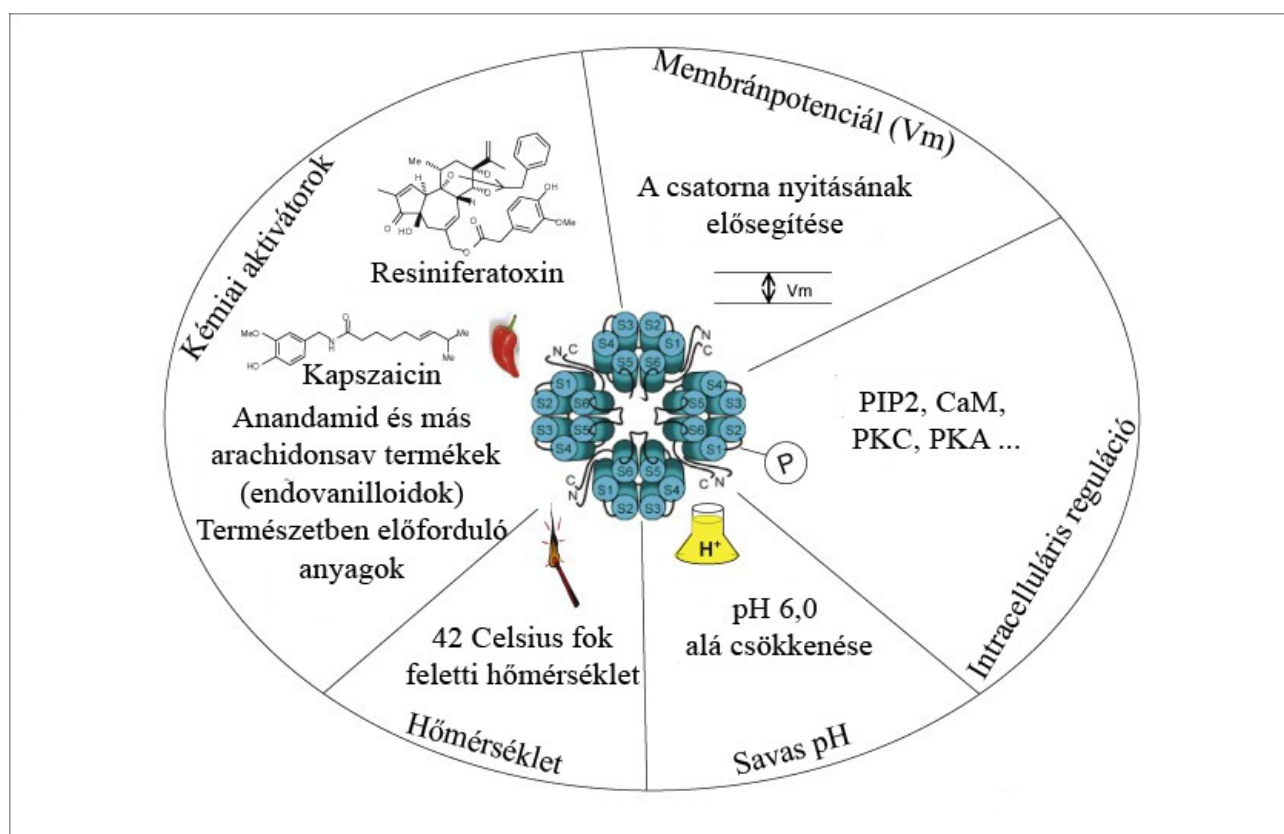
A szenzoros neuronokban expresszálandó TRPV1 számos élettani hatásra aktiválódhat. Ilyen a szerotonin (5-HT), bradikinin, prosztaglandinok, ATP, hisztamin és a protonkoncentráció emelkedése. Ennek hatására az idegvégződésekben dokkolt neurotranszmitterek (P-anyag, SP és kalcitonin-gén hasonló peptid, CGRP) kiszabadulnak és lokális efferens hatásokat váltanak ki. Az ábra (Khairatkar-Joshi, Árpád Szallasi 2009) alapján (Figure 1) készült.

1.4.2. A TRPV1 aktiválásának módjai

A TRPV1 aktivációjáról az utóbbi évek során az a kép alakult ki, hogy abban számos aktivációs útvonal részt vehet. A TRPV1 felismerésében, funkcióinak feltárásában, a klónozásában és a

gyógyszerfejlesztésben a kapszaicin iránt mutatott érzékenysége és tágabb értelemben a kapszaicin kötőhelyen keresztül történő szabályozása óriási jelentőségű (5. ábra). Ennek ellenére a kapszaicin kötőhelyhez kötődő ligandokkal történő élettani szabályozásának jelentősége korántsem egyértelmű. Az eddig azonosított endovanilloidok hatékonysága, szintézise és szöveti koncentrációja arra utal, hogy ezen anyagok nem egyedüli szerepet játszanak a TRPV1 *in vivo* szabályozásában.

Ezen adatok szerint a TRPV1 a sejt környezetében lévő potenciálisan fájdalmas fizikai és kémiai hatások integrátora (5. ábra) (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.



5. 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 (Gunthorpe, Chizh 2009) alapján (Figure 1) készült.

1.4.3. A TRPV1 vaszkuláris biológiai szerepe

A TRPV1 vaszkuláris biológiai jelentősége némileg háttérbe szorult az új típusú, közvetlenül a nociszenzorra ható fájdalomcsillapító molekulák ígértét 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, 4. ábra). Ezzel a mechanizmussal összhangban leírták, hogy a TRPV1 stimulációja vazodilatációt vált ki mezenteriális, 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 a 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; 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 molekuláris farmakológiája

1.5.1. Kis molekulatömegű természetben előforduló TRPV1 ligandok

A TRPV1 kutatásának első eredményeit a természetben előforduló kapszaicinnal kapott adatok jelentették. A kapszaicin hatásainak tudományos alaposágú vizsgálata 1878-ban Högyes Endre közleményével kezdődött (Högyes 1878). Már itt felismerésre került, hogy a kapszaicin elsősorban

az idegrendszerre hat. A kapszaicint az utrapotens (a kapszaicinnél sok esetben 1000-szer hatékonyabb) resiniferatoxin felfedezése követte a TRPV1-re ható természetes vegyületek közül (Szallasi, Blumberg 1989). A következő azonosított, TRPV1-et aktiváló természetes molekula az alkaloidok közé tartozó evodiamid (Kobayashi et al. 2001) és a meroterpenoid cannabidiol (Bisogno et al. 2001), melyet a gingerolok (Dedov et al. 2002), a fenilpropán eugenol (Yang et al. 2003), a prenilált fenolok közé tartozó scutigerol (Szallasi et al. 2009) és a szeszkviterpén-dialdehidek közé tartozó izovelleral (Szallasi et al. 2012) követett. Talán érdemes megemlíteni, hogy az itt felsorolt agonisták egy részében megfigyelhető, hogy a maximális hatásuk hőmérsékletfüggést mutat. Ez arra utal, hogy a szónak a szoros értelmében nem minden esetben beszélhetünk agonistákról, hanem a hatásuk helyes elnevezése érzékenyítők lenne. Úgy tűnik ugyanis, hogy ezen anyagok a TRPV1 nyitásának hőküszöbét csökkentik a kísérletekben alkalmazott hőmérsékleti érték alá, és így vezetnek a csatorna megnyílásához (Vriens et al. 2009).

A TRPV1 antagonistá hatású természetes molekulák közül az indolilpoliaminok közé tartozó, pókokból izolált vegyületeket (Kitaguchi, Swartz 2005), az általunk azonosított szeszkviterpén laktonok közé tartozó thapsigargin és a negatív töltésű peptideket (spermin, spermidin, putreszcin) említhetjük (Ahern et al. 2006).

1.5.2. A TRPV1 potenciális endogén ligandjai

Sokáig a receptor környékének savanyodását tartották a TRPV1 legfontosabb élettani aktivátorának (Bevan, Geppetti 1994). Ez az elképzelés azonban napjainkra már kevésbé elfogadott. A pH csökkenése mellett felvetették arachidonsav származékok szerepét is. A legelső közlemény ebben a vonatkozásban az anandamid (N-arachidonil etanolamin) szerepét vizsgálta (Zygmunt et al. 1999). Ezt követte még számos további arachidonsav származék. A TRPV1-en aktívnak bizonyult számos lipoxigenáz termék, úgymint a 5- 12- és 15-(S)-HETE, az 5- és 15-(S)-HPETE, valamint a

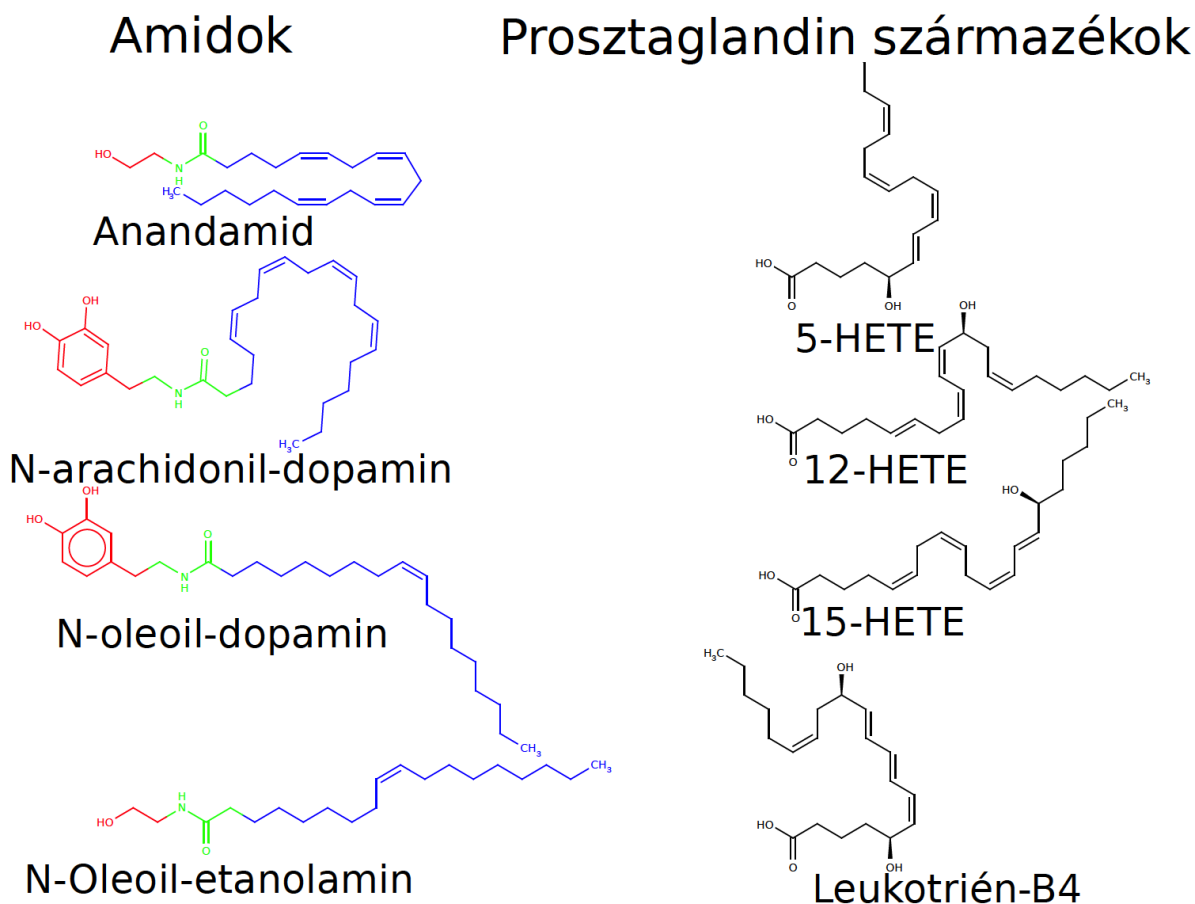
leukotrién B₄ (Hwang et al. 2000). A lipoxigenáz termékek mellett az arachidonsavnak bioaktív aminosavakkal képzett vegyületei is fontos szerepet játszhatnak. Ilyen vegyület az N-arachidonil dopamin (NADA) (Huang et al. 2002). A dopamin TRPV1-en aktív vegyületei közül a lipofil régióban az arachidonsav mellett más lipid is állhat, úgymint az az N-oleoil dopamin (OLDA) esetében látható (Chu et al. 2003). Emellett az etanolaminok közül sem csak az arachidonsavval képzett vegyület (anandamid) aktív, hanem az oleoil-etanolamin is (De Petrocellis et al. 2004).

A meggyőző *in vitro* kísérleti eredmények dacára ezen vegyületek esetében a TRPV1 aktivációjához szükséges koncentráció a mikromoláris tartományba esik, ami az élettani koncentrációtartományhoz képest magas. Ennek alapján a TRPV1 élettani szabályozása független lehet ezen anyagoktól.

A 6. ábra néhány eddig leírt endogén TRPV1 agonista szerkezetét mutatja be. A kapszaicin szerkezete alapján a TRPV1-en ható molekulákat általában 3 régióra szokás osztani (lásd 7. ábra), mely régiókat azokban az esetekben, amikor azok egyértelműen elkülöníthetők színezéssel jelöltem.

A TRPV1-et nem csak kémiai, hanem olyan fizikai hatások is aktiválhatják, mint a hőmérséklet (Tominaga et al. 1998). Ismét meg kell említeni, hogy bizonyos vélemények szerint a hőmérséklet a TRPV1 legfontosabb regulátora, és a receptorhoz kötődő molekulák jelentős része (a pH csökkenését is beleértve) csak a receptor megnyílásához szükséges hőmérsékleti értékeket csökkenti (Ryu et al. 2003).

A TRPV1 aktivitásának és ligandokkal szemben mutatott érzékenységének szabályozásában az intracelluláris jelátviteli útvonalak is fontos szerepet játszhatnak. Ezen jelátviteli útvonalak közül érdemes megemlíteni a protein kináz C-t (Premkumar, Ahern 2000), a protein kináz A-t (Bhave et al. 2002), és a CaM kináz II-t (Fang et al. 2002). Napjainkra már nem kérdés, hogy ezen intracelluláris foszforiláción alapuló szabályozás fontos szerepet játszhat, de a különböző foszforilációs folyamatok élettani jelentősége még nem kellően tisztázott.



6. ábra: Néhány endogénen előforduló TRPV1 agonista

Az ábrán a TRPV1 endogén ligandjai közül két nagy csoport (amidok és prosztaglandin származékok) néhány tagjának szerkezete látható. A TRPV1 ligandok szerkezetét három régióra szokás osztani (7. ábra), melyeket az egyértelműen azonosítható „B” régió esetén az ábrákon színekkel tüntetnek fel: „A” régió: piros, „B” régió: zöld, „C” régió: kék. Amennyiben a „B” régió nem azonosítható egyértelműen, a szerkezeti képleteket színekkel ábrázoltam.

Végül, a receptor endogén ligandjainak tárgyalása kapcsán meg kell említenem azt is, hogy bizonyos vélemények szerint (Szolcsányi, Sándor 2012), amivel jómagam is egyetérték, a TRPV1 sokkal inkább endogén gátlás alatt áll, mintsem a fent említett, receptorhoz közvetlenül kötődni képes ligandok aktiválnák. Ennek magyarázata lehet, hogy olyan endogén gátló hatású molekulák, mint a resolvinok (Park et al. 2011), illetve a negatívan töltött peptidek (spermin, spermidin, puteszcin) esetében (Ahern et al. 2006) a stabilitási állandó talán közelebb állhat a fízológias körülmények között megfigyelhetőhöz.

1.5.3. A TRPV1-en ható exogén agonisták fejlesztése

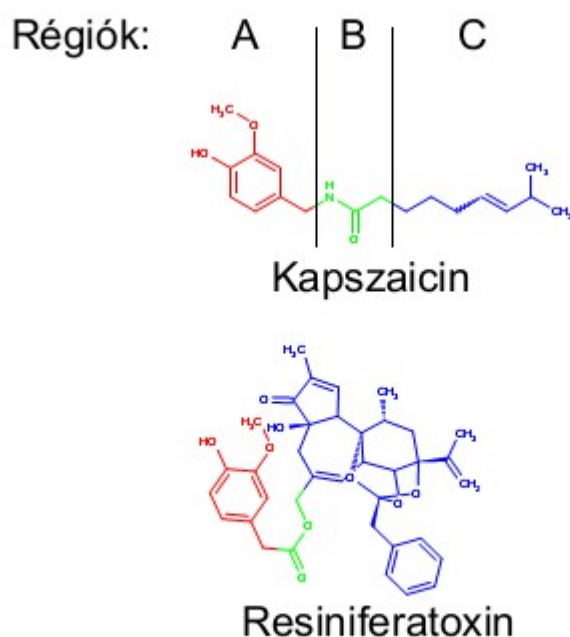
Mint azt már korábban bemutattam a TRPV1 kutatása több, mint egy évszázaddal ezelőtt a kapszaicin hatásainak leírásával kezdődött. Ebben a folyamatban mérföldkőnek számított az a felismerés, hogy a kapszaicin nem csak aktiválja (mely folyamat kevésbé kívánatos a nagyfokú fájdalom miatt), hanem deszenzibilizálja is a receptort (Jancsó et al. 1967). Ennek megfelelően a TRPV1-en ható agonisták fejlesztésének két fontos gyógyszerügyi célja lehet: egyrészt segíthetnek a TRPV1 ligandkötési tulajdonságainak pontosabb megértésében, másrészt használatukkal a deszenzibilizáció jelenségét felhasználva a kezdeti stimulációt követően hosszú távú TRPV1 funkció csökkentést lehet elérni. Arról sem szabad elfeledkezni, hogy a TRPV1-re ható antagonisták fejlesztése során mindenképpen szükséges a receptor funkció gátlásának meghatározása, mely funkciót sokáig egyedül a kapszaicinnal kiváltott aktiváció gátlásaként definiálták.

Az elsőként felismert agonista a kapszaicin volt, így a TRPV1 kezdetekben kapszaicin receptorként volt ismert. Valójában ez az időszak volt az, amikor Hőgyes Endre, Jancsó Miklós, Jancsó-Gábor Aranka, Szolcsányi János és Jancsó Gábor révén a TRPV1 kutatása hungarikumnak volt tekinthető. Csaknem valamennyi jelentős eredmény magyar kutatók munkásságához kötődött, amelynek hátrányát jelentette, hogy ennek mértékében volt mellőzve a globális farmakológiai szemléletben. Ennek az időszaknak a végét jelentette, amikor a kapszaicin receptoron ható resiniferatoxint azonosította Szállási Árpád Peter M. Blumberg laboratóriumában (7. ábra), ugyanis ekkor világossá vált, hogy a kapszaicin mellett a receptor a vanilloid csoporttal rendelkező egyéb molekulák kötésére is képes. Ennek következtében a receptor elnevezését vanilloid receptorra változtatták meg (Szallasi, Blumberg 1989), melyet a receptor klónozását követően a fehérje szerkezeti-fejlődési tulajdonságokat előtérbe helyező nemzetközi elnevezésrendszer alapján követett a TRPV1 elnevezés.

Mint azt említettem, a gyógyszerügyi erőfeszítések a TRPV1 gátlására irányulnak. Ennek

ellenére le kell szögezni, hogy a klinikai gyakorlatba a TRPV1-en ható molekulák közül mindeddig csak a kapszaicin tartalmú anyagokkal, különösen a külsőleg alkalmazott kenőcsökkel (például Qutenza tapaszt, NGX4010) (Wallace, Pappagallo 2011) végzett kezelések kerültek be. Emellett előrehaladott klinikai vizsgálatok stádiumában van az Anesiva által fejlesztett AlgrX-4975 (Adlea) (Remadevi, Szallasi 2008) és Winston Laboratories által fejlesztett, szintén kapszaicin tartalmú Civamid (<http://www.winstonlabs.com/productdevelopment/civamide.asp>).

Eleinte komoly erőfeszítések történtek arra, hogy a TRPV1 agonisták hatását modulálják, a fájdalmat kiváltó hatásokat molekuláris farmakológiai eszközökkel csökkentsék a deszenzibilizáló hatás megtartása mellett. Ezen erőfeszítések azonban látszólag háttérbe kerültek a közvetlen TRPV1 gátló terápiás lehetőség mellett.



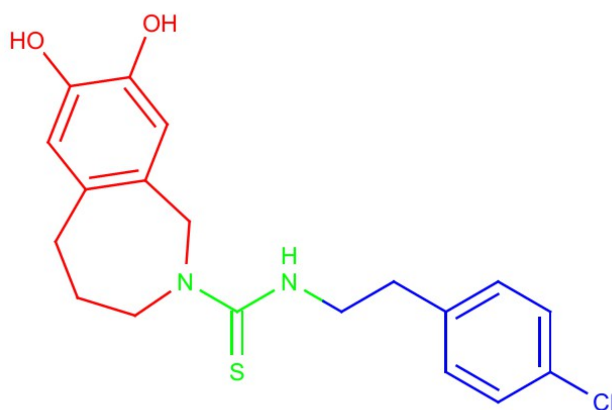
7. ábra: A legfontosabb TRPV1 agonisták

A kapszaicin szerkezetében három régiót szokás azonosítani. A régiókat színnel jelöltem: „A”: piros, „B”: zöld, „C”: kék.

1.5.4. A TRPV1-en ható exogén antagonisták fejlesztése

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 capsazepine tartalmazta először a „B” régióban a 1,3-di(arilalkil)tiourea csoportot, amely később számos sikeres TRPV1 antagonistá fontos szerkezeti eleme lett (8. ábra).



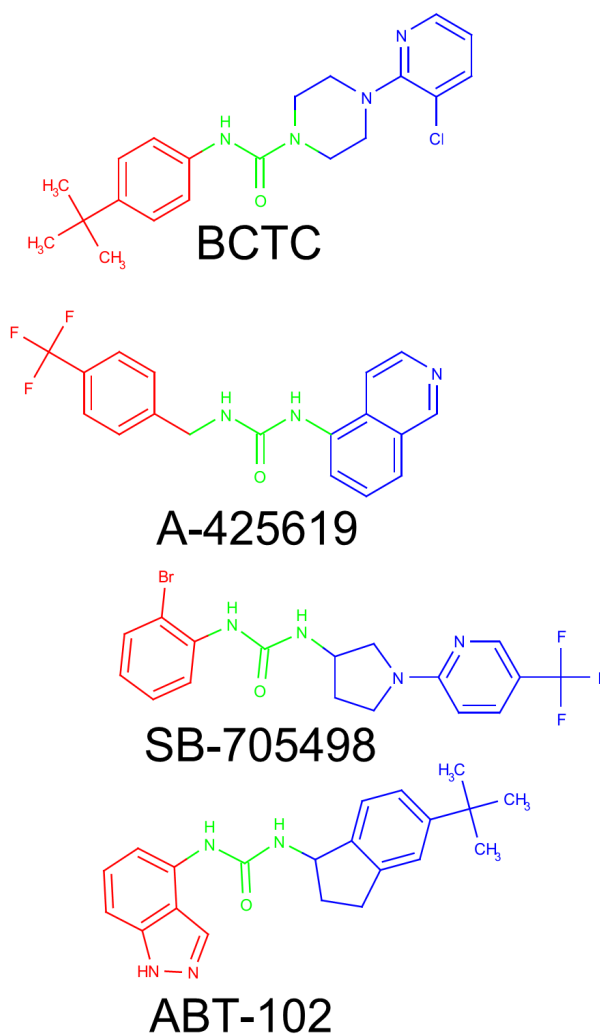
Capsazepin

8. ábra: A capsazepine szerkezete

A capsazepine szerkezetében színekkel jelöltem az „A”, „B” és „C” régiókat

dc_652_12

Számos TRPV1 antagonistista szintézisének homovanillamin csoportból indultak ki, amelyet a megfelelő C-régió kialakítása érdekében különböző csoportokkal reagáltattak. Ennek eredményei az urea származékok, melyek közül jelentősebbnek a BCTC, A-425619, SB-705498 és az ABT-102 kódjellel ellátott vegyületek bizonyultak (9. ábra).

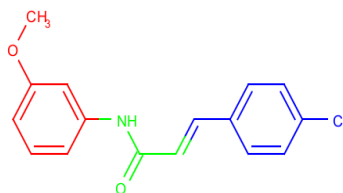


9. ábra: TRPV1 antagonisták: urea származékok

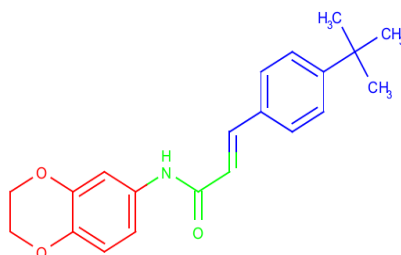
A TRPV1 regulátorok legnépesebb csoportját az amidok alkotják, közéjük tartozik a kapszaicin is. Igen gyakran homovanillamin szerves savakkal képzett vegyületei. Az amidok számos további alcsoportra oszthatóak. Ide tartoznak például a cinnamidok. Ennek a csoportnak első jelentős, publikált tagja az SB-366791 volt 2004-ben. Ezt követte a preklinikai vizsgálatokban

dc_652_12

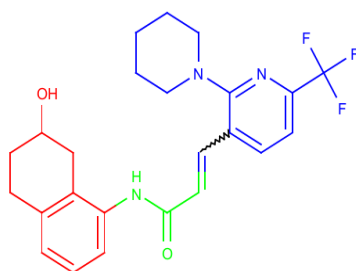
előszeretettel alkalmazott AMG9810, az AMG0347 és a klinikai kipróbálások fázisában lévő JTS-653 és PAC-14028 (10. ábra).



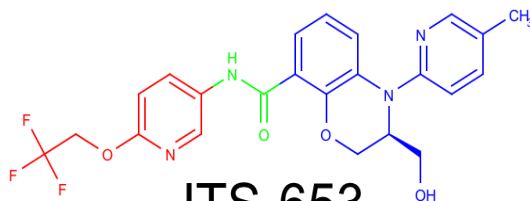
SB-366791



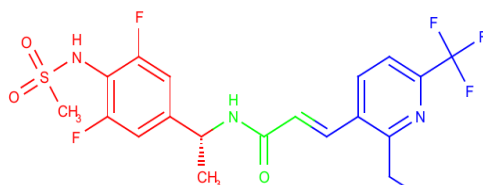
AMG-9810



AMG-0347



JTS-653

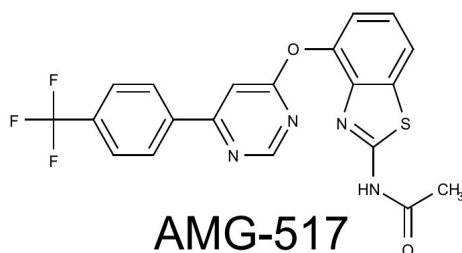


PAC-14028

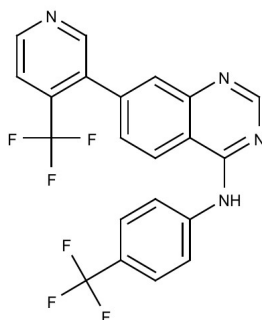
10. ábra: TRPV1 antagonisták: amid származékok

dc_652_12

Végül, számos a fenti csoportba nem tartozó antagonistára is sor került, melyek a „B” régióban nem mutatnak jelentős hasonlóságot az eddig bemutatott vegyületekkel. Ezek klinikai kipróbálások alatt lévő tagjait, az AMG-517-et és az MK-2295-öt (korábbi nevén NGD 8243), melyeket a 11. ábra mutat be.



AMG-517

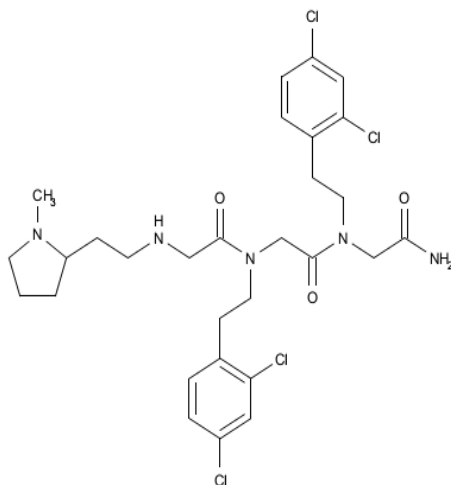


MK-2295 / NGD-8243

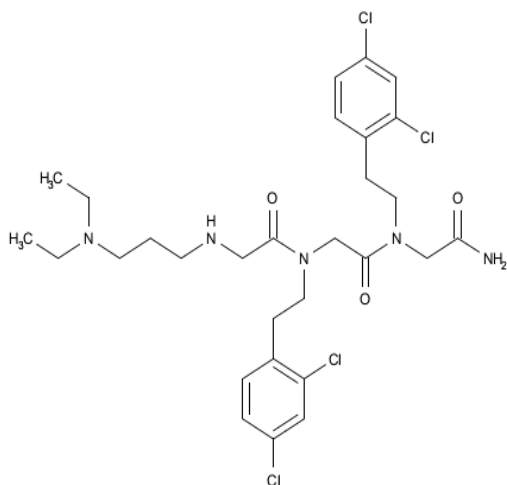
11. ábra: TRPV1 antagonisták: új templátok

Az eddig bemutatott TRPV1 ligandok mindegyike a kapszaicin kötőhelyen fejti ki hatását. Ezen kötőhely funkcionális szerepét igazolja, hogy a kifejlesztett ligandok egy része valóban sikeresen képes gátolni a fájdalom különböző formáit. Emellett azonban új farmakológiai támadáspontokat is azonosítottak a TRPV1-en, melyek ugyan befolyásolhatják a kapszaicin aktivációt, de nem a kapszaicin kötőhely elérhetőségének modulálásával (nem kompetitívek a kapszaicinnal) (12. ábra).

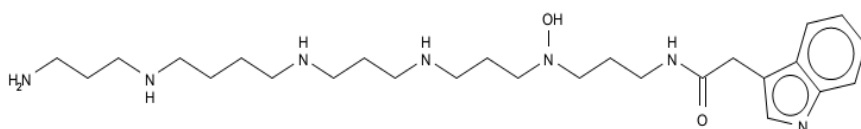
dc_652_12



H-Arg-15-15 / DD-161515



DD-191515

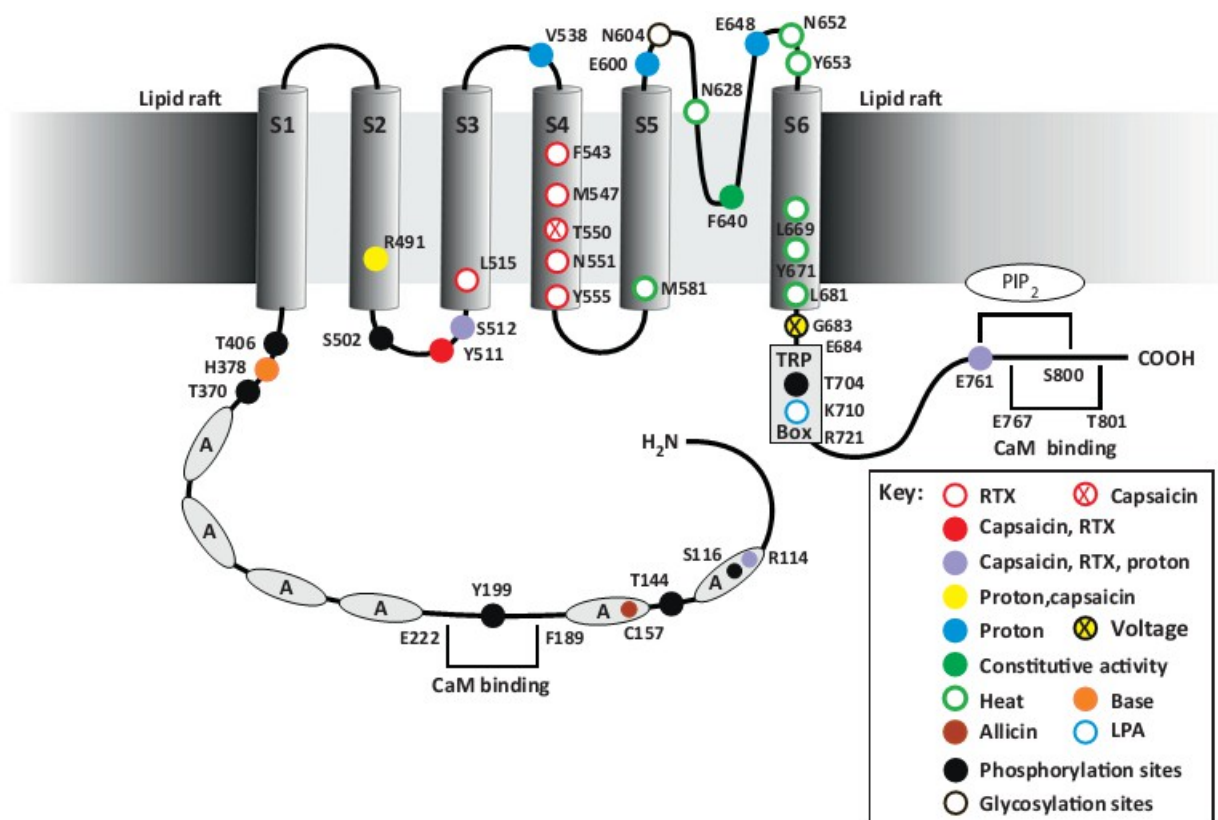


AG-489

12. ábra: Kapszaicintől eltérő helyhez kötődő TRPV1 antagonisták

1.5.5. A TRPV1 kapszaicin kötőhelye és egyéb funkcionális régiói

A TRPV1 kutatásában utóbbi években jelentős előrelépés történt a fehérje különböző funkciókat ellátó régióinak azonosításában. Ennek során kezd kirajzolódni a TRPV1 molekuláris szerkezete, a különböző funkciókért felelős aminosavak elhelyezkedése, amelyet a 13. ábra mutat be (Szolcsányi, Sándor 2012) alapján. 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).



13. ábra: A TRPV1 moduláció molekuláris alapja

Ezen az összefoglaló ábrán a TRPV1 aktivitás szabályozásában részt vevő régiók és aminosav oldalláncok kerültek bemutatásra. Jól láthatóak a 3. és 4. transzmembrán szakaszok között elhelyezkedő vanilloid kötőhelyen (capsaicin és resiniferatoxin, RTX) fontos aminosav oldalláncok (piros körök). A receptor protonokkal történő szabályozását a kékkel jelölt extracelluláris aminosav oldalláncok biztosítják. Üres zöld karikákkal a hőszabályozásban fontos elemek, barnával az allicin és feltehetőleg egyéb SH reagenszek által módosított cisztein, míg fekete körökkel a foszforilációs helyek láthatóak. Az ábra (Szolcsányi, Sándor 2012) alapján (Figure 2) készült.

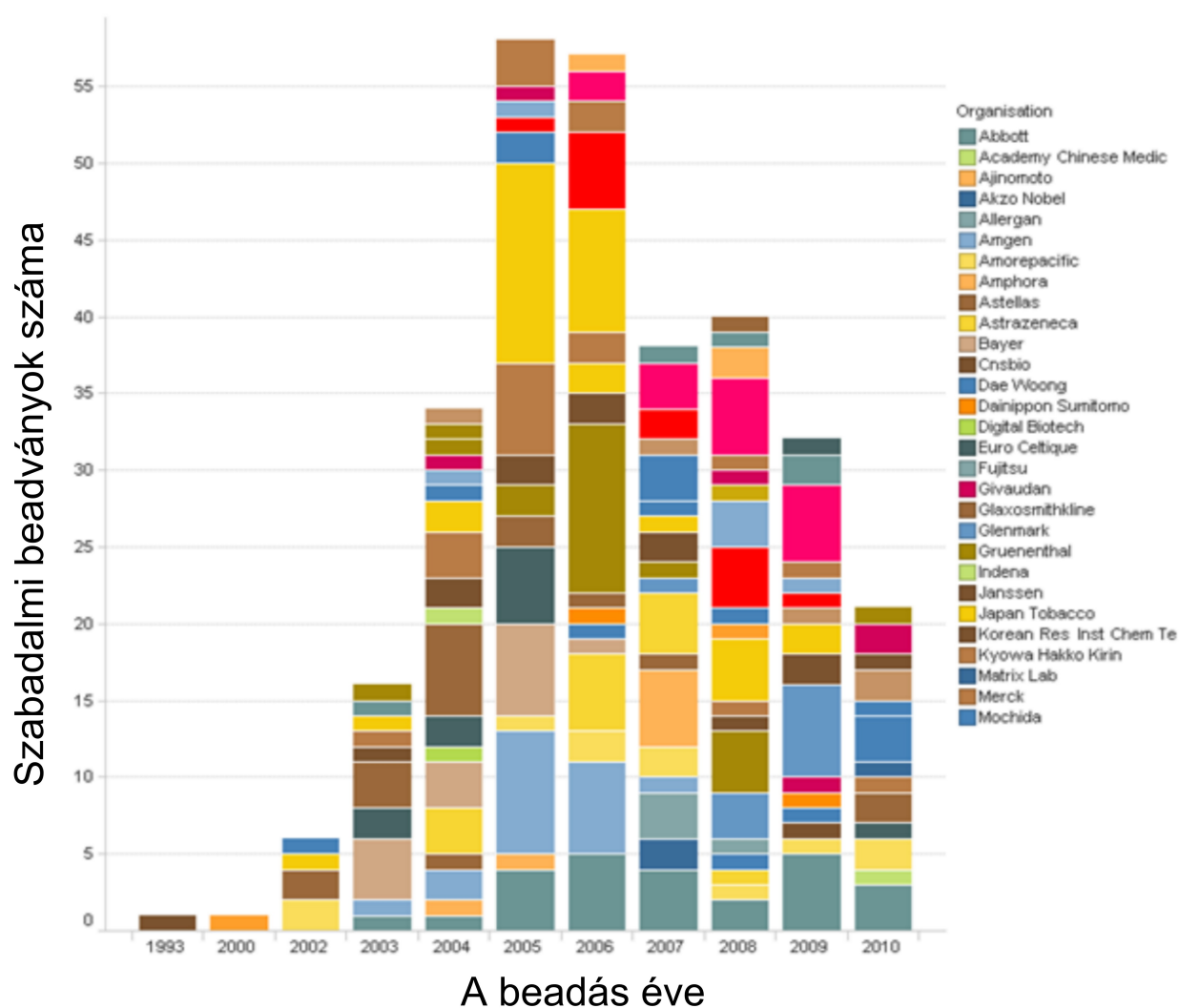
A molekuláris mintázattól szembetűnő, hogy a TRPV1 kapszaicin kötőhelye a 3-as és a 4-es transzmembrán régiókban helyezkedik el, amely a pórusformáló régió (5-6 transzmembrán szakaszok és a közöttük lévő hurok) közelében helyezkedik el. A kötőhely ismeretében az *in silico* molekulatervezés alapjai is megteremtődhetnek. Mi több, az egyre részletesebb szerkezeti ismereteink hozzásegíthetnek ahhoz is, hogy a receptor számos aktivációs lehetőségére szelektív ligandokat lehessen tervezni és szintetizálni (Lee et al. 2011). Az ilyen erőfeszítések eredményeként az *on target* mellékhatások jelentős része is elkerülhetővé válhat.

A másik fontos terület, ahová a receptor szerkezetének megismerése elvezetett a receptor élettani regulációjának megértése. Úgy tűnik, hogy a receptor aktivitásának szabályozásában a ligandkötés mellett az intracelluláris hatásoknak is fontos szerepe van. A receptoron több foszforilációs hely található, a foszforilációval történő szabályozás lehetőségére utalva. Ennek folyamatában fontos szerepe lehet gyulladásos mediátoroknak (például a prosztaglandinoknak), melyek PKA függő módon is képesek fokozni a TRPV1 aktivitását (Mohapatra et al 2005). Más idegsejtre ható anyagoknak (például bradikinin és neuronális növekedési faktor), a célpontja a foszfolipáz C enzim, melynek stimulációja kettős hatású lehet a sejten belül. Egyrészt a PIP₂ szint csökkentésével képes a receptor deszenzibilizációját csökkenteni (Prescott, Julius 2003), másrészt a diacil-glicerolok szintézise révén képes a PKC enzimeket aktiválva a TRPV1-et érzékenyíteni (Premkumar, Ahern 2000; Vellani et al. 2001) és a sejtmembránban történő lokalizációját stabilizálni (Olah et al. 2002).

Végül, az utóbbi években felismerték azt is, hogy a TRPV1 lipid környezetének is jelentős hatása van a receptor funkcionális tulajdonságaira. A sejtmembrán lipid tartajainak eltávolítása bizonyos esetekben (például a koleszterin szint csökkentése) szelektíven érintette a TRPV1 aktivátorok hatását, míg más lipid komponensek (gangliozidok) szintjének csökkentése ligand független módon csökkentette a TRPV1 aktiválhatóságát (Szőke et al. 2010).

1.5.6. Iparági áttekintés

A TRPV1 klónozásáról 1997-ben számoltak be. Az eltelt 15 év alatt több, mint 300 szabadalom (14. ábra) ellenére sem sikerült azonban a piacon megjeleníteni TRPV1-re ható molekulákkal. A beadott szabadalmak esetében azonban jól látszik, hogy csaknem valamennyi jelentős gyógyszergyárnak van TRPV1-en fejlesztési programja.



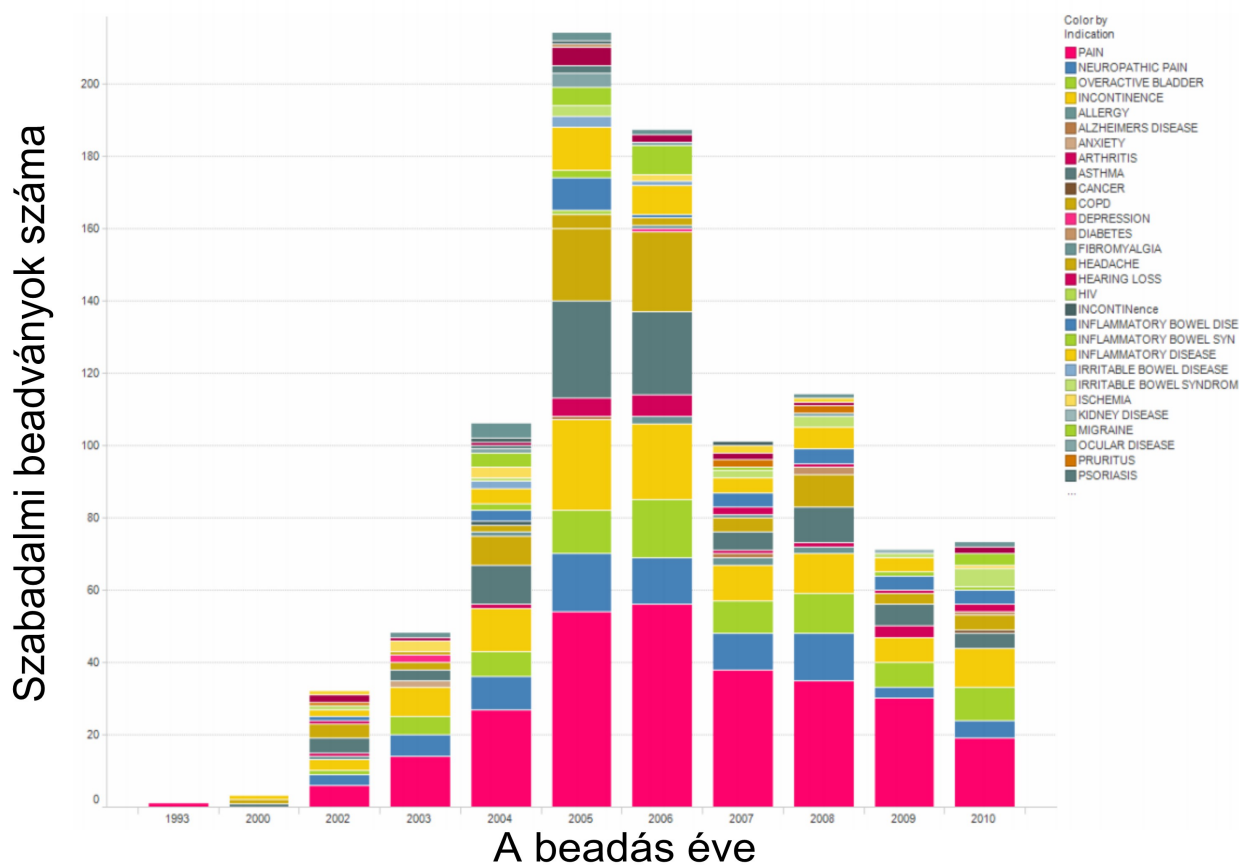
14. ábra: A TRPV1-en ható molekulák szabadalmaztatása: cégek szerint

Az adatok forrása: Derwent World Patent Index

A szabadalmi aktivitás jobbára egy gazdasági-iparági adat. Molekuláris farmakológiai szempontból talán fontosabb, hogy egy molekuláris célpontot milyen betegségekben tartanak

dc_652_12

fontosnak. A szabadalmi aktivitás alapján a TRPV1 szerepét több, mint 30 betegségállapotban valószínűsítették, melyek között a fájdalom, vagy a fájdalommal járó állapotok dominálnak, de jelentős számban előfordulnak a tüdő (COPD, asztma) és a húgyhólyag (gyulladás, inkontinencia) betegségei is (15. ábra).



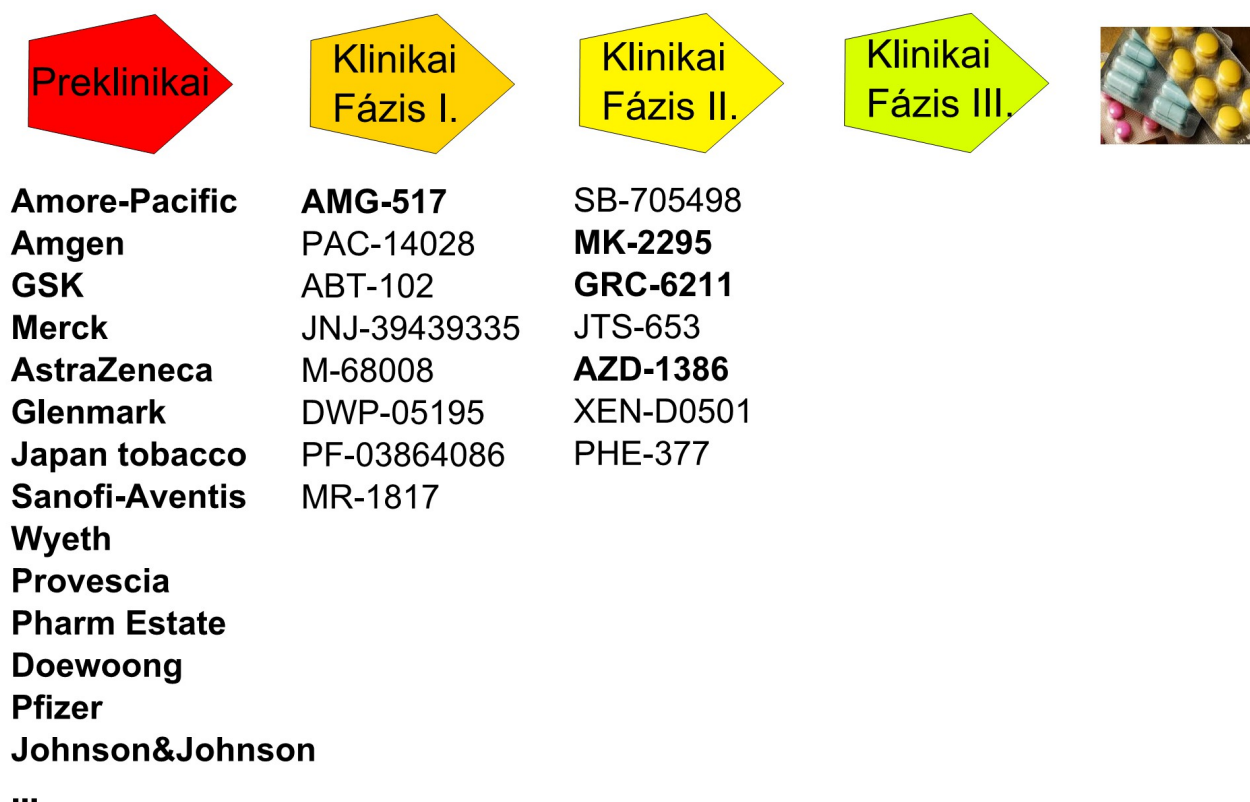
15. ábra: A TRPV1-en ható molekulák szabadalmaztatása: betegségcsoportok szerint

Az adatok forrása: Derwent World Patent Index

A szabadalmi adatok tehát arra utalnak, hogy a TRPV1-en ható gyógyszerek fejlesztése érdekében jelentős erőfeszítések történnek. Ennek ellenére klinikai fázisba a kifejlesztett molekulák csak egy kis hányada jutott el. A TRPV1, mint egy molekuláris támadáspont szempontjából különösen veszélyes, hogy a klinikai fázisig eljutott molekulák egy jelentős részénél is súlyos mellékhatások jelentkeztek. A 16. ábra mutatja azon cégeket, akiknek klinikai fázisba került

dc_652_12

molekulát sikerült fejleszteniük. A különböző fázisokban lévő molekulákat felsoroltam az interneten (www.clinicaltrials.org) elérhető adatok alapján. A kedvezőtlen mellékhatások miatt további fejlesztésre alkalmatlannak bizonyult gyógyszerjelöltek (akik esetében a klinikai kipróbálásokat megszakították) vastag betűvel jelöltem.



16. ábra: TRPV1 antagonisták a klinikai fejlesztés fázisaiban

Az ábrán a gyógyszer klinikai gyakorlatba történő bevezetésének különböző szakaszai láthatóak a preklinikai fejlesztéstől a gyógyszertárban hozzáférhető formulációig. A preklinikai fázis megjelölése alatt feltüntettem azon gyógyszergyárak nevét, amelyek esetében találtam olyan adatot, hogy TRPV1 antagonisták fejlesztés során klinikai kipróbálást szerveztek, függetlenül attól, hogy ez sikeres volt-e. A különböző klinikai fázisok alatt feltüntettem azon molekulákat, amelyeket az adott fázisnak megfelelő vizsgálatokban teszteltek. Kövérrel szedtem azokat a molekulákat, amelyek esetében a klinikai vizsgálatot felfüggesztették.

2. Módszerek

Ezen fejezetben az értekezésben a bemutatott eredmények túlnyomó többségét megalapozó módszereket említem.

2.1. *Arteriola izoláció patkány vázizomból és érátmérő meghatározás*

Wistar patkányok (Charles River, Magyarország) altatása intraperitoneális Na-pentobarbitáttal (50 mg/kg) történt. Ezt követően a *musculus gracilis*-ből sztereo mikroszkóppal egy mintegy 1,5 mm hosszúságú arteriola szakasz kimetszése történt. A kimetszett eret egy speciálisan kialakított szervkádba helyeztük, majd mindkét végén üvegkapillárisokkal megkanuláltuk. A kanulálást jégben hűtött Ca^{2+} -mentes KREBS oldatban végeztük (110 mM NaCl, 5,0 mM KCl, 2,5 mM CaCl_2 , 1,0 mM MgSO_4 , 1,0 mM KH_2PO_4 , 5,0 mM glükóz és 24,0 mM NaHCO_3 , pH 7,4, melyet 10% O_2 -t és 5% CO_2 -t tartalmazó gázzal buborékolattunk át. A mindkét oldalukon kanulált mikroereket szilikon csövekkel egy nyomás-szervo rendszerhez csatlakoztattuk (Living Systems, St. Albans, Vermont, USA) mely rendszer segítségével módunk nyílt az intraluminális nyomás változtatására 20-120 Hgmm értékek között. Az erek rögzítését követően az intraluminális nyomást 80 Hgmm-re emeltük, majd a szervkád és a benne lévő KREBS oldat hőmérsékletét 37°C-ra emeltük és a kísérlet végéig ezen a hőmérsékleten tartottuk. Az erek átmérőjét videomikroszkópos módszerrel a kapillárisokon rögzített érszakasz közepén határoztuk meg. Az állatkísérletek a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérletes Etikai Bizottságának engedélyével történtek.

2.2. *CHO-TRPV1 sejtek tenyésztése*

A kísérletekhez egy olyan CHO sejtvonalat használtunk fel, amely a patkány TRPV1 szekvenciáját egy tetraciklin regulált stabil expressziós rendszerben tartalmazta (CHO-TRPV1 sejtek). A CHO-TRPV1 sejteket Ham F-12 médiumban tenyésztettük, mely médiumot 10% marha szérummal, 25

mM HEPES-sel (pH 7,5), 250 µg/ml G418-cal (Life Technologies, Rockville, MD, USA) és 1 mg/l tetraciklinnel (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) egészítettünk ki. A kísérletek előtti napon a sejtek tenyésztőoldatát tetraciklin nélküli oldatra cseréltük a TRPV1 expresszió indukciója érdekében (tet-off rendszer).

2.3. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvételi kísérletek

A kísérletekhez CHO-TRPV1 sejteket 24 lyukú műanyag sejttenyésztő edényekben tenyésztettük 20-40%-os konfluencia értékig. Ennek elérését követően a sejttenyésztő oldatot tetraciklin nélküli oldatra cseréltük, hogy a TRPV1 expressziót indukáljuk. A kísérleteket két nappal ezt követően végeztük. Ekkorra a CHO-TRPV1 kultúra teljesen benőtte a rendelkezésére álló felszínt. A kísérletek során a sejteket Ca^{2+} tartalmú DPBS (Life Sciences, Rockville, MD, USA) pufferrel mostuk, melyet 0,25 mg/ml BSA-val (Sigma, St. Louis, MO, USA) egészítettünk ki. A mosott sejteket ebben a pufferben inkubáltuk a pufferben magában, vagy olyan anyagokkal, mint a TRPV1 antagonisták, vagy PKC aktivátorok, foszfátáz inhibitorok, 5-15 percig 37°C-on (200-400 µl/well). Ezt követően adtuk a TRPV1 agonistákat a $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -mal együtt (1 µCi/ml, MP Biomedicals, Irvine, CA, USA). A sejtekben történő $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felhalmozódást leggyakrabban 15 perc inkubációt követően (37°C-on) határoztuk meg. Ehhez a sejteket alaposan mostuk (legalább 3-szori mosás) DPBS-ben, majd lehetőleg az összes felülúszót leszívtuk. Ezt követően a sejteket RIPA pufferben szolubilizáltuk (összetétele: 50 mM Tris-Cl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, és 1% Na-deoxikólsav) szobahőmérsékleten rázatva a pléteket legalább 60 percig. Ezt követően ebből az oldatból 300 µl radioaktivitását határoztuk meg. A kapott adatok alapján kiszámítottuk a teljes lyukban (wellben) lévő radioaktivitás mennyiségét és az ugyanazon pléten lévő kontrollok (agonistával nem kezelt sejtek a háttérrel, míg az 1 µM kapszaicinnal kezelt sejtek a maximális TRPV1 mediált $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvétel értékét adták) segítségével számítottuk a relatív $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvételt. Minden egyes adatponthoz 4 párhuzamos mérés esetében kapott értékeket átlagoltuk és legalább

három kísérletet végeztük. Az individuális kísérletekből származó adatokat a Hill egyenletnek megfelelően illesztettük a kapott $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvétel alkalmazott dózisok függvényében történő ábrázolása után.

2.4. Intracelluláris Ca^{2+} koncentráció becslése

CHO-TRPV1 sejteket 25 mm átmérőjű üveglemezekre szélesztettük és 6 well plétekben tenyésztettük (tenyésztő folyadék: Ham F-12 médium 10% marha szérummal, 25 mM HEPES (pH 7,5), 250 $\mu\text{g/ml}$ G418 és 1 mg/l tetraciklin). Amikor a sejtek konfluenciája elérte a 20%-ot, akkor a sejtek tenyésztőoldatát tetraciklin nélküli, de 1 μM Na-butirátot tartalmazó oldatra cseréltük. Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció mérését következő napon végeztük. Ennek során az üveglapokhoz asszociálódó sejteken lecseréltük a tenyésztő folyadékot 1% BSA-t és 5 μM FURA-2-AM-et (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) tartalmazó DPBS oldatra. A sejteket ebben az oldatban tartottuk 2 óráig sötétben, szobahőmérsékleten. Ezt követően a sejteket újra mostuk és a kísérletekig DPBS-ben tartottuk szobahőmérsékleten. A kísérleteket is DPBS-ben végeztük. Ennek során a 25 mm átmérőjű üveglemezeket egy speciális szövetkádba helyeztük, amelyet egy mikroszkóp tárgyasztalán váltakozva 340 és 380 nm-es hullámhosszúságú fénnel világítottunk meg, míg a sejtekből érkező emittált fényt 510 nm felett detektáltuk egy megfelelő kamerával (Incyte Imaging system, Cincinnati, OH, USA). A sejtek kezelését a speciális szervkádiban végeztük, amikor már rögzítettünk legalább 30 időpontban a sejtek nyugalmi (kísérletek előtti) intracelluláris Ca^{2+} koncentrációját. Az ílymódon folyamatosan rögzített képi információt a kísérleteket követően offline értékeltük Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) és Graph Pad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) szofverekkel. A változásokat leggyakrabban az abszolút értékeknek (340/380 gerjesztés mellett kapott fluoreszcencia intenzitás aránya) megfelelően mutattuk be.

2.5. Immunhisztokémia

A szöveteket Tissue-Tek O.C.T. beágyazó oldatban (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) folyékony levegőbe helyezéssel tettük alkalmassá a kriosztátban történő metszésre. 10 µm-es vastagságú metszeteket készítettünk, melyeket adhezív tárgylemezre helyeztünk és acetonnal fixáltunk 10 percig. Az immunhisztokémia során a nemspecifikus kötőhelyeket kecske IgG-vel (1,5% DPBS-ben) blokkoltuk 20 percig, szobahőn. Ezt követően a metszetekkel TRPV1, simaizom aktin (SMA) neurofilament (NF) antitesteket (hígítás általában 1:100) inkubáltunk legalább egy órán át a blokkoló oldatban. A metszeteket ezt követően mosattuk DPBS-sel és az elsődleges antitestek kötődését fluoreszcensen, vagy biotinnal jelölt másodlagos antitestek segítségével mutattuk ki. A színreakciót Vector VIP szubsztráttal tettük láthatóvá (biotinált másodlagos antitestek esetén) és a képeket látható fényben készítettük, vagy fluoreszcens másodlagos antitestek esetén fluoreszcens, esetenként konfokális mikroszkópiát alkalmaztunk.

2.6. [³H]-resiniferatoxin (RTX) kötődési kísérletek

A kísérleteket heterológ rendszerekben expresszált patkány TRPV1-en és patkány gerincvelői preparátumokon végeztük. A heterológ rendszerben történő TRPV1 expresszióhoz a CHO-TRPV1 sejteket fenntartó médiumban tartottuk (Ham F-12 médium 10% marha szérummal, 25 mM HEPES (pH 7,5), 250 µg/ml G418 és 1 mg/l tetraciklin) T75-ös sejtenyészítő flasksokban. A konfluens tenyészetet 1:8 arányban osztottuk meg, minek eredményeként a második napon az újonnan szélesztett tenyészetek konfluenciája 50-70% volt. Ezt követően a sejteket indukáló médiumban (fenntartó médium G418 és tetraciklin nélkül, de 1 mM Na-butirátot hozzáadva) tartottuk további két napig. Ezt követően a sejteket tripszin-EDTA tartalmú HAM F-12 médiummal (Life Technologies, Rockville, MD, USA) választottuk el a felszínről. A felszedett sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze (3 000 g, 10 perc) és a pelleteket a kísérletekig -20°C-on tartottuk fagyasztva.

A kísérletek egy másik részében endogén TRPV1-et tartalmazó membránokat preparáltunk kifejlett Sprague-Dawley patkányok gerincvelejét felhasználva. A patkányokat CO₂ inhalációval túlaltattuk és ezt követően a gerincvelőt kimetszettük. A kimetszett gerincvelőt ollóval aprítottuk, majd egy üveg homogenizáló segítségével homogenizáltuk 10 ml Ca²⁺ és Mg²⁺ mentes, jégbe hűtött DPBS-ben (Life Technologies, Rockville, MD, USA). A kapott homogenizátumot lecentrifugáltuk (5 000 g, 15 perc) és a kapott pelleteket -20°C-on tároltuk a kísérletekig.

A kötődési kísérletek során az alkotókat jégben mértük össze. A reakcióelegy tartalmazott: 0,1 mg/ml CHO-TRPV1 sejt membrán vagy 0,5 mg/ml gerincvelői membrán kivonatot, 0,25 mg/ml BSA-t (Cohn V. frakció, Sigma, St. Louis, MO, USA), [³H]resiniferatoxint ([³H]RTX; 37 mCi/mol; Perkin Elmer, Boston, MA, USA) és a nem radioaktív kompetáló ligandokat Ca²⁺ és Mg²⁺ mentes DPBS-ben. A reakcióelegy végtérfogata 400 µl, a reakcióidő legalább 60 perc volt, 37°C-on. A reakciót jégbe hűtéssel és 200 µg marha glikoprotein frakció VI (α-glikoprotein, 100 µl-ben, ICN, Costa Mesa, CA, USA) hozzáadásával állítottuk le. A ligand kompetíciós kísérletekben a [³H]RTX

dc_652_12

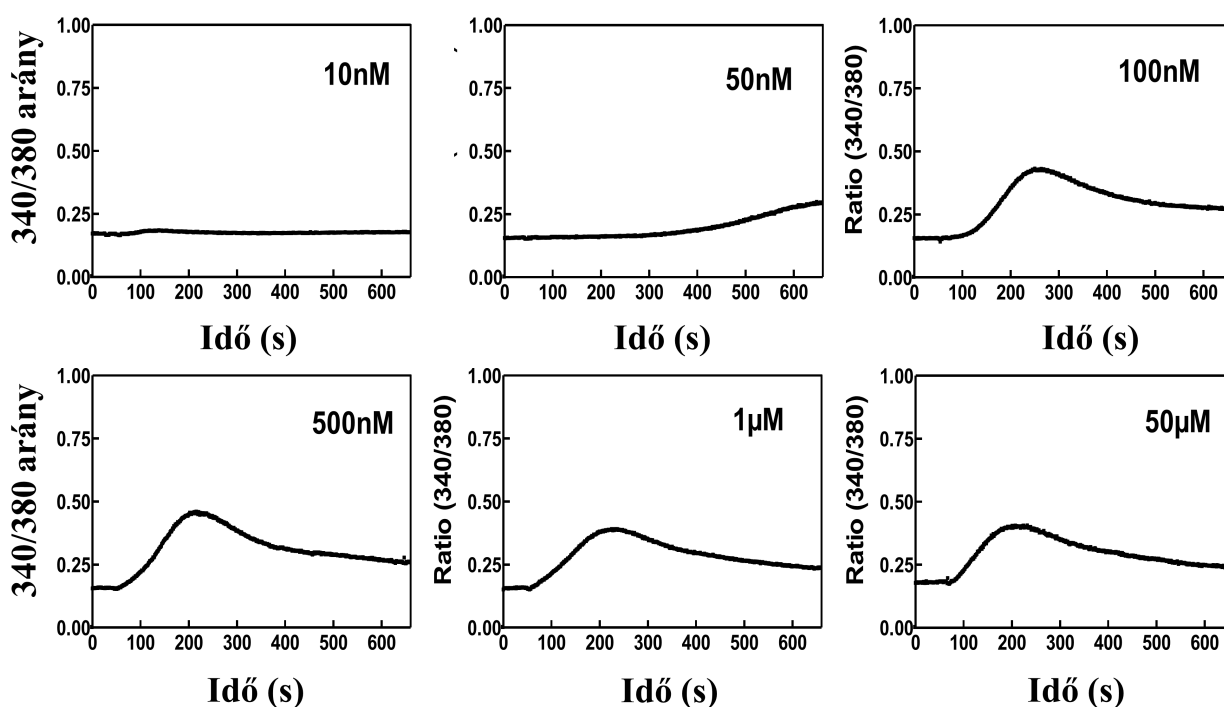
koncentrációja 40-80 pM volt, míg a nem-specifikus kötődést 100 nM RTX jelenlétében határoztuk meg. A membránokhoz kötődő [³H]RTX-et a felülúszóban található (szabad) formától centrifugálással különítettük el (15 perc, maximális fordulatszám, Beckman 12 benchtop centrifuga). A teljes pelletben és a 250 µl felülúszóban található radioaktivitást β-számlálóval határoztuk meg.

3. Eredmények

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

3.1.1. A thapsigargin mint egy természetben előforduló TRPV1 antagonist.

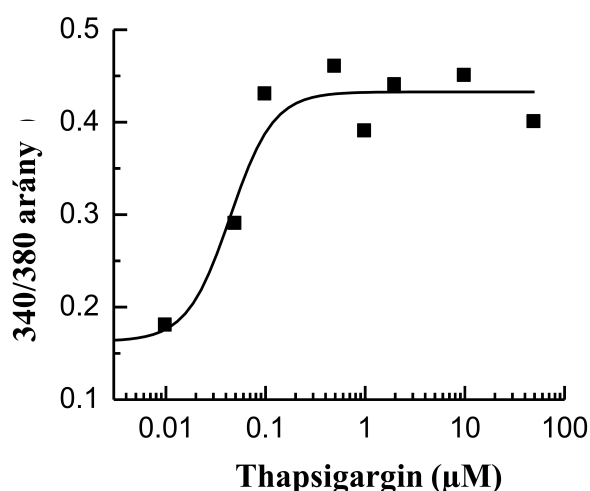
A TRPV1 expresszió CHO-TRPV1 sejtekben a sejtmembrán mellett a citoszolban is megfigyelhető, amely felveti annak lehetőségét, hogy a TRPV1 (a szenzoros neuronokkal ellentétben, ahol valószínűleg nincs endoplazmatikus membránrendszer) ebben a heterológ expressziós rendszerben intracelluláris membránokban 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 (17. ábra).



17. ábra: Thapsigargin hatására az intracelluláris Ca-ion koncentráció megemelkedik

Az ábrán a thapsigargin alkalmazását követő intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változások láthatóak CHO-TRPV1 sejteken. A válaszokat egy Ca^{2+} imaging rendszeren rögzítettük. Az egyetlen látómezőben elhelyezkedő, legalább 11 sejtről kapott jeleket átlagoltuk és azt mutatjuk az ábrán. Az adott kísérletben alkalmazott thapsigargin koncentrációt szintén feltüntettük (Tóth et al. 2002).

A félmaximális intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedés kiváltásához szükséges thapsigargin koncentráció az ismételt kísérletekben 44 nM-nak adódott (18. ábra). Ezen eredményeink összhangban voltak a thapsigargin SERCA gátló hatásával.

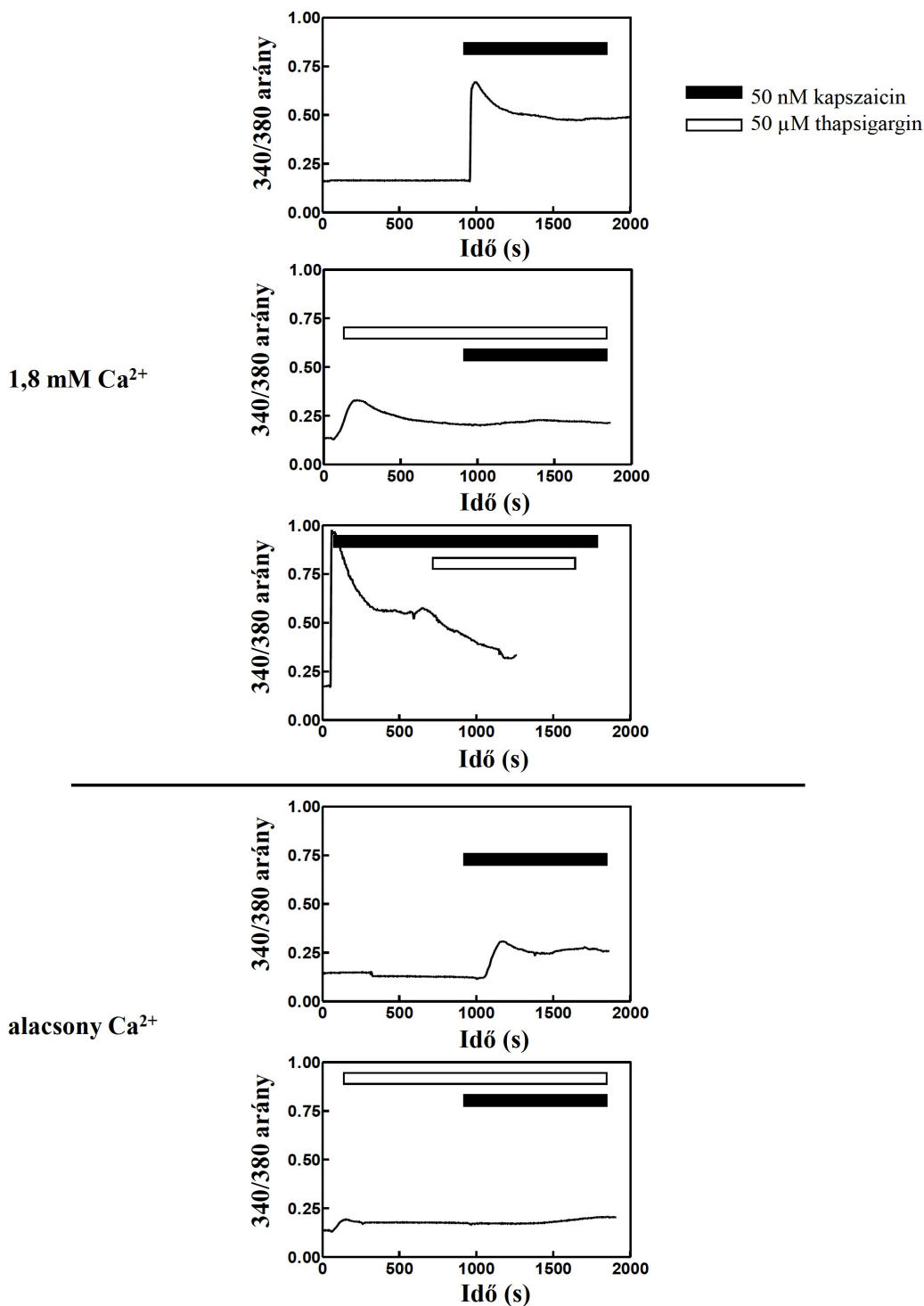


18. ábra: A thapsigargin koncentráció-hatása az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációra

A kísérletek során rögzített maximális intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedéseket ábrázoltuk az alkalmazott thapsigargin koncentrációjának függvényében. A kapott pontokat nemlineáris függvénnyel (Hill egyenlet) illesztettük, hogy a hatékonyság és a hatáserősség értékeket számíthassuk (Tóth et al. 2002).

A thapsigargin tehát alkalmasnak tűnt arra, hogy az endoplazmatikus Ca^{2+} raktárakat kiürítse. Így CHO-TRPV1 sejteken vizsgáltuk a TRPV1 stimulációjának hatását thapsigarginnal történő előkezelés után. A kísérlet során az intracelluláris Ca^{2+} raktárak kiürítéséhez szükségtelenül nagy koncentrációjú thapsigargin kezelést alkalmaztunk, és azt tapasztaltuk, hogy a thapsigargin jelenlétében a kapszaicin hatására nem következett be intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedés (19. ábra). 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 (19. ábra). Ez arra utalt, hogy a thapsigargin közvetlenül is gátolhatja a TRPV1-et.

dc_652_12

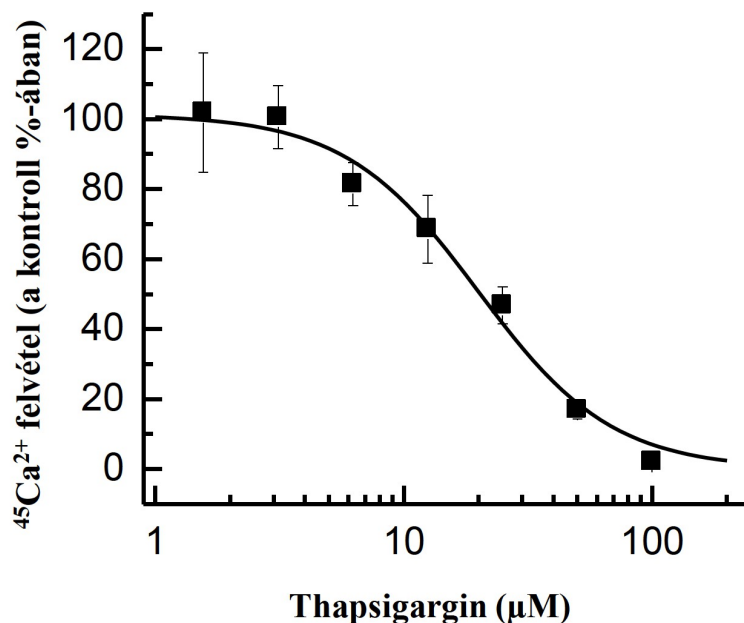


19. ábra: Thapsigargin gátolja a TRPV1 aktivációt

CHO-TRPV1 sejtek intracelluláris Ca²⁺ koncentráció változásait mértük a DPBS oldatban (Ca²⁺ mentes oldat, alacsony Ca²⁺) és 1,8 mM Ca²⁺ hozzáadásával. A TRPV1 specifikus válaszokat 50 nM kapszaicin (a kinetikai ábrákon a jelenlétét kitöltött fekete sávval jelöltük) alkalmazásával vizsgáltuk, míg a nagy dózisu thapsigargin hatásait 50 μM koncentrációban (jelenlétét üres sáv jelzi) tanulmányoztuk. Az ábrákon individuális kísérletekből (egy látótér) származó sejtek válaszainak átlagolt értéke látható (Tóth et al. 2002).

Ennek ellenőrzésére a plazmamembránon keresztüli, TRPV1 mediált Ca²⁺ felvételt mértük

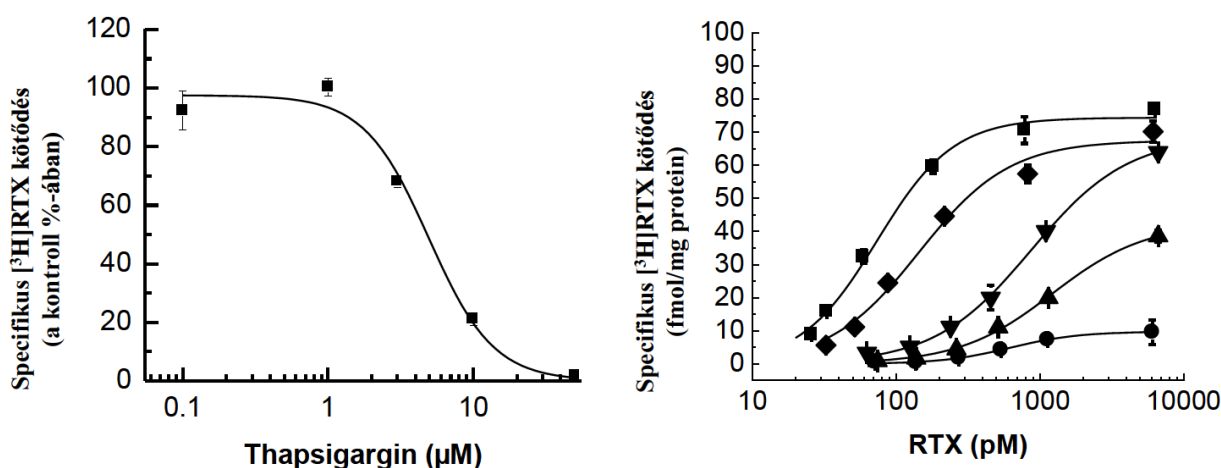
20. ábra. Eredményeink szerint a thapsigargin gátolta a kapszaicin mediált $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvételt, a félmaximális gátláshoz szükséges koncentráció $6,4 \pm 1,9 \mu\text{M}$ volt.



20. 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).

Végül, annak eldöntésére, hogy a thapsigargin a kapszaicin kötőhelyen fejti-e ki a gátló hatását ligandkötődési kísérleteket végeztünk $[^3\text{H}]\text{RTX}$ felhasználásával. A $[^3\text{H}]\text{RTX}$ kötődését különböző thapsigargin koncentrációk mellett követtük CHO-TRPV1 sejtek membrán preparátumain 21. ábra. Eredményeink szerint a thapsigargin képes volt a $[^3\text{H}]\text{RTX}$ 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 $[^3\text{H}]\text{RTX}$ kötődését a thapsigargin vegyes mechanizmussal gátolja, amelyben a közvetlen kompetíción túl a receptor konformációjára gyakorolt hatásnak is szerepe lehet.

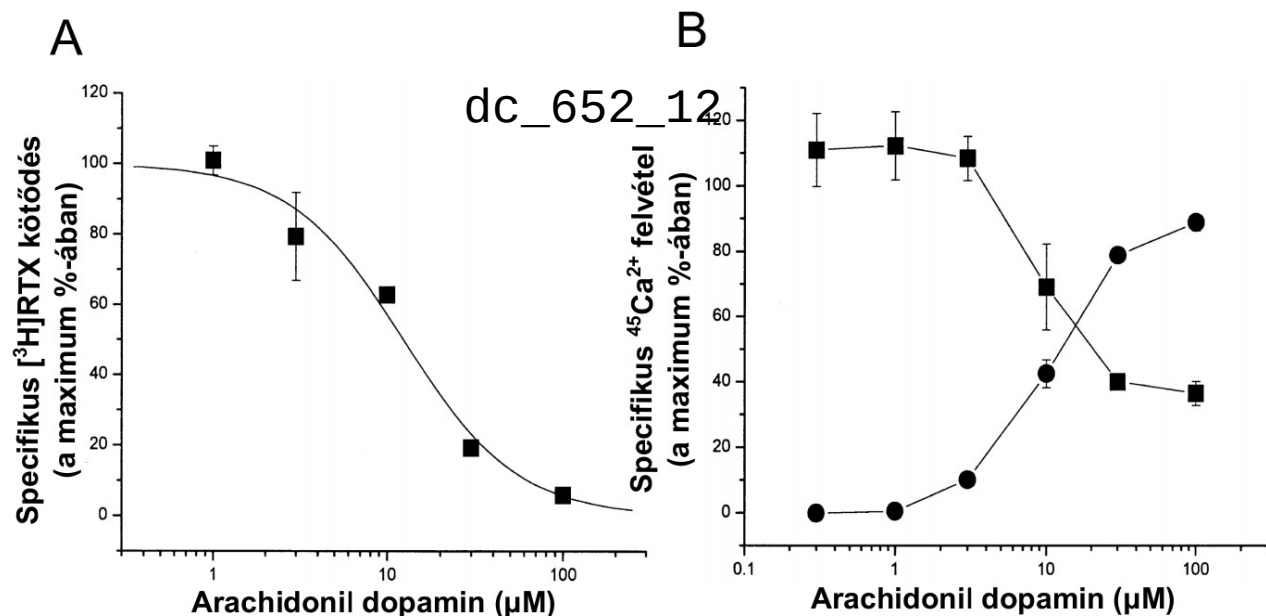


21. ábra: A thapsigargin a TRPV1 kapszaicin kötőhelyéhez is kötődik

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).

3.1.2. 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 (22. 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 (22. 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. Ezt az elképzelést is vizsgáltuk a heterológ módon expresszált patkány TRPV1-en (22. ábra, B panel).



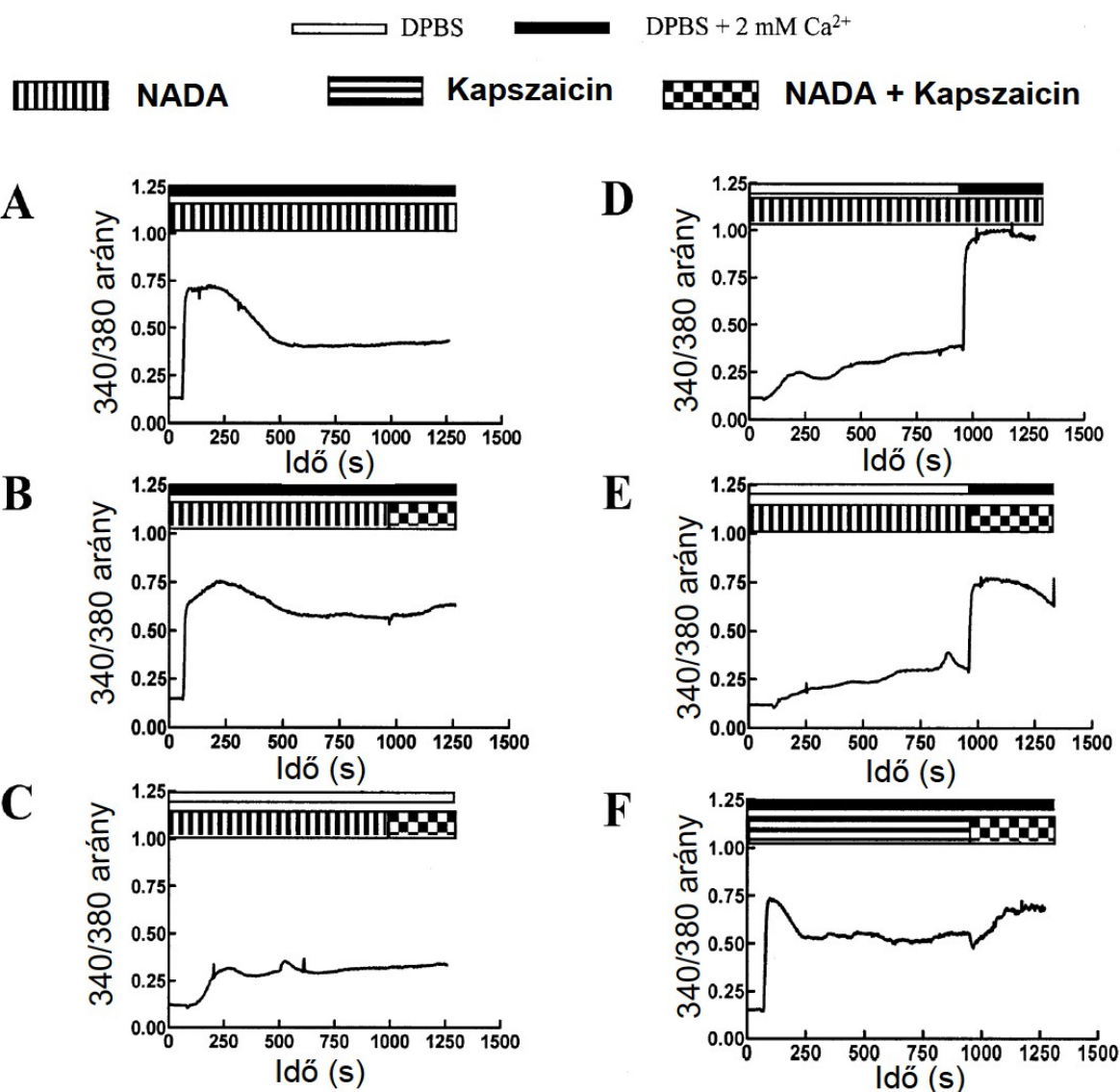
22. ábra: Az N-arachidonil dopamin kötődik a TRPV1-hez és befolyásolja annak aktivitását

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).

A NADA hatékonyságát ezt követően számos *in vitro* helyzetben vizsgáltuk intracelluláris Ca^{2+} koncentráció mérésével a CHO sejtekben expresszáltatott patkány TRPV1-et felhasználva (23. ábra). A kísérletek során az alkalmazott NADA koncentráció 50 μM , míg a kapszaicin koncentráció ennek 1000-ed része, 50 nM volt. Az első kísérletben (A panel) azt találtuk, hogy a NADA ezen magas dózisban aktiválja a TRPV1-et. Az aktiváció átmeneti hatásként jelentkezett, amennyiben a NADA jelenlétében a sejtek intracelluláris Ca^{2+} koncentrációja csaknem azonnal megemelkedett, majd a NADA folyamatos jelenlétében egy a kezdeti értéknél alacsonyabb szinten stabilizálódott (azaz ebben a rendszerben részleges deszenzibilizáció volt megfigyelhető). Amikor a kapszaicint ezen steady state állapotban alkalmaztuk, akkor a kapszaicin nem volt képes az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt tovább emelni (B panel). Ugyanezt a kísérletet alacsony extracelluláris Ca^{2+} koncentráció mellett is megismételtük (C panel) és azt láttuk, hogy az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változás mértéke jelentősen alacsonyabb, ami arra utalt, hogy a folyamatban a

dc_652_12

plazmamembrában lokalizálódó TRPV1 játszik fő szerepet. Ezt követően vizsgáltuk annak lehetőségét, hogy a NADA alacsony extracelluláris Ca^{2+} koncentráció esetében esetleg képes a TRPV1-et deszenzibilizálni, mely hipotézis nem igazolódott (D és E panelek). Végül, azt is ellenőriztük, hogy a kapszaicin kezelést követő részleges deszenzibilizáció (hatáscsökkenés a kapszaicin jelenlétében) során a NADA képes-e a TRPV1-et újra aktiválni (F panel). 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.



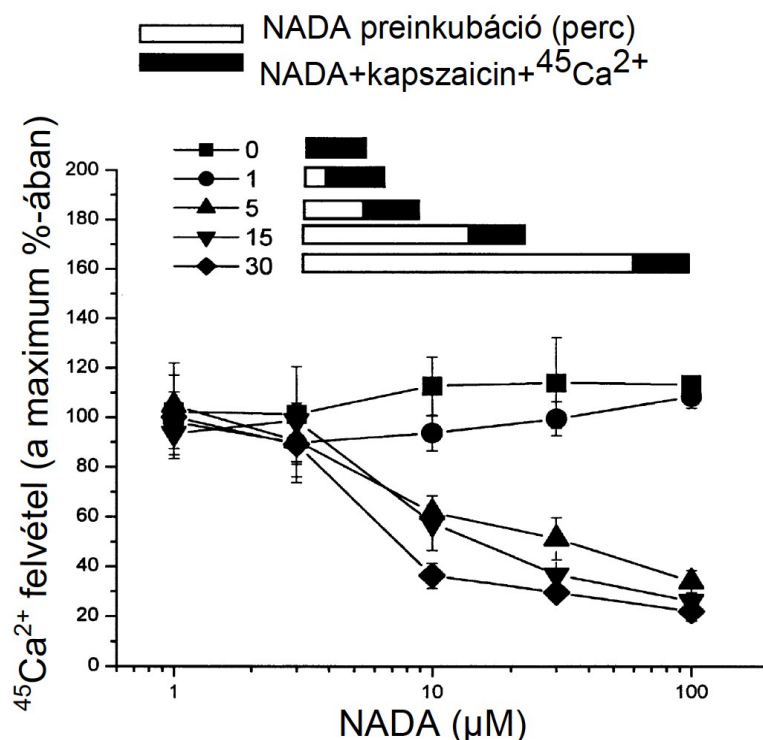
23. ábra: A NADA aktiválja és bizonyos körülmények között gátolhatja a TRPV1-et

CHO-TRPV1 sejtek intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változásait mértük N-arachidonil dopamin (NADA) és estenként kapszaicin jelenlétében. A NADA önmagában alkalmazva élettani extracelluláris Ca^{2+} koncentráció mellett egy tranziens emelkedést váltott ki (A panel). A B panelen bemutatott adatok szerint a kapszaicin 50 nM-os koncentrációban nem tudja befolyásolni az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt az 50 μM -ban alkalmazott NADA mellett. Extracelluláris Ca^{2+} hiányában mindkét TRPV1 agonista esetében jelentősen kisebb hatást kaptunk (C panel). A D panel tanulsága szerint a NADA által kiváltott intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedés feltétele az extracelluláris Ca^{2+} jelenléte. Az E panel adatai szerint a kapszaicin és NADA együttes alkalmazása sem vált ki nagyobb intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedést, mint ezen anyagok külön történő alkalmazása. Végül, az F panelen az látszik, hogy az 50 μM NADA mennyiben befolyásolja az intracelluláris Ca^{2+} válaszokat 50 nM kapszaicin jelenlétében (Tóth et al. 2003).

A NADA esetleges TRPV1 gátló hatását $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvételén alapuló kísérletekben ellenőriztük.

Ezen kísérletekben a radioaktívan jelölt Ca^{2+} felvételét 5 percig mértük kapszaicin (50 nM) jelenlétében, de előtte a sejteket különböző ideig (1, 5, 15, 30 percig) előinkubáltuk NADA-val (24. ábra). Eredményeink szerint a NADA 10 μM -os koncentrációtól képes volt legalább 5 perces

előinkubálás esetén a TRPV1-et gátolni.



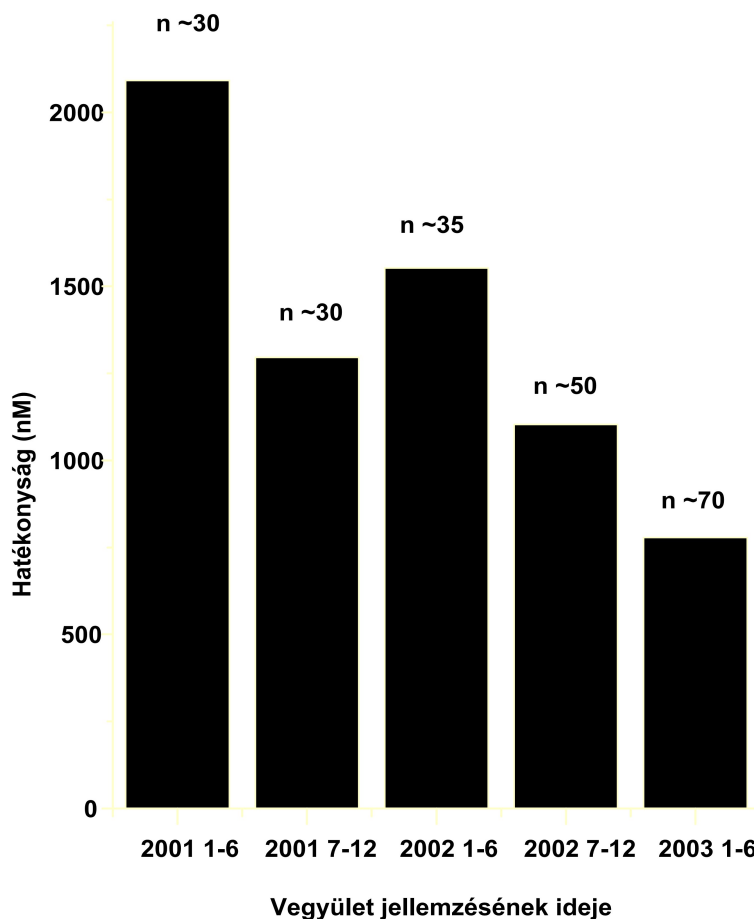
24. ábra: A NADA potenciális TRPV1 gátló hatása

A NADA egy nagyobb hatásereőségű TRPV1 agonistával szemben antagonistaként viselkedhet. Ennek ellenőrzésére CHO-TRPV1 sejteket NADA jelenlétében (koncentráció az x-tengelyen jelölve) inkubáltuk, mielőtt a sejteket 50 nM kapszaicinnal kezeltük $^{45}\text{Ca}^{2+}$ jelenlétében. A kezelés időzítése az ábrán mutatva (a sávok mellett lévő szám a kapszaicin hozzáadása előtti NADA inkubáció időtartamát mutatja. A $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvételt a NADA nélkül inkubált sejtek esetében mért értékek %-ában fejeztük ki (Tóth et al. 2003).

3.2. A TRPV1 molekuláris farmakológiája

A TRPV1-en ható molekulák fejlesztésébe Peter M. Blumberg laboratóriumában kapcsolódtam be, ahol Jeewoo Lee szülői 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 (25. ábra). Mi több, a periódus végére a leghatékonyabb vegyületek hatékonysága már a pikomólos tartományba esett.



25. ábra: Peter M. Blumberg laboratóriámában, közreműködésemmel végzett molekulafejlesztés

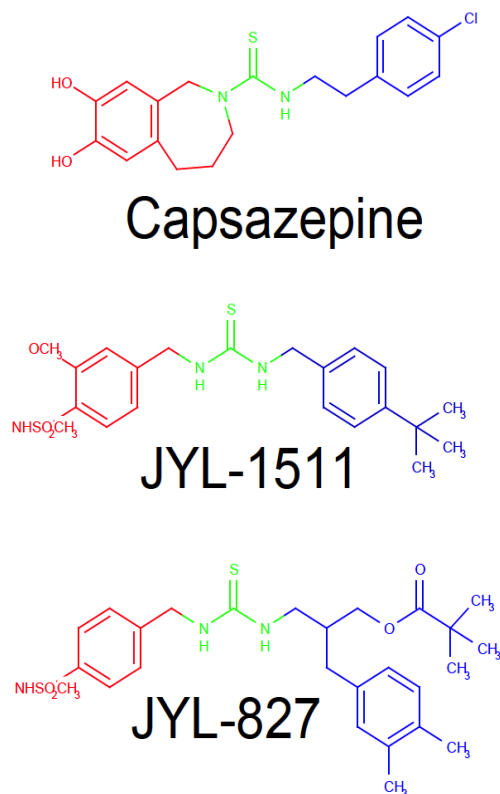
Az oszlopok tetején látható, hogy az adott időszakban hány vegyületet kaptunk Jeewoo Lee koreai laboratóriumából. Az y tengelyen látható az adott időszakban (x-tengelyen év hónaptól-hónapig) kapott vegyületek átlagos *in vitro* hatékonysága. A meghatározások mintegy felét végeztem én ebben a periódusban.

3.2.1. Parciális agonisták

Peter M. Blumberg laboratóriumában legelső feladatomban a JYL-1511-es kódszámú molekula tesztelése volt. A molekula a capsazepineben felismert tiourea „B” régiót (zöld, 26. ábra) tartalmazta. Az „A” régió (piros színnel jelölve, 26. ábra) fenil csoportjához az akkoriban rendkívül sikeresnek mondható, és a laboratóriumban vezérstruktúrájának használt metánszulfonamid csoport

dc_652_12

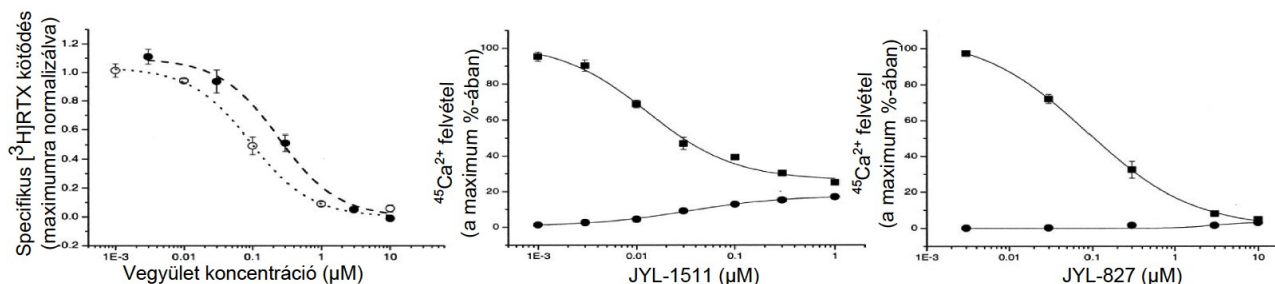
került beépítésre. A molekulák fejlesztése során kettős célt kívántunk megvalósítani. Egyrészt az „A” régióban a fenil csoporton történő további szubsztitúciók hatását teszteltük, másrészt a resiniferatoxinban található rendkívül komplex „C” régiót (a „C” régió kékkel jelölve, 26. ábra) próbáltuk egyszerűbb struktúrákkal helyettesíteni.



26. ábra: A JYL-1511 és a JYL-827 szerkezete

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, B panel, 27. ábra), míg amikor a vegyület hatását önmagában a TRPV1-re vizsgáltam, akkor mindig volt némi aktiváció a $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvétel tanulsága szerint ($17,4 \pm 0,6\%$ agonizmus, B panel, 27. ábra). 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

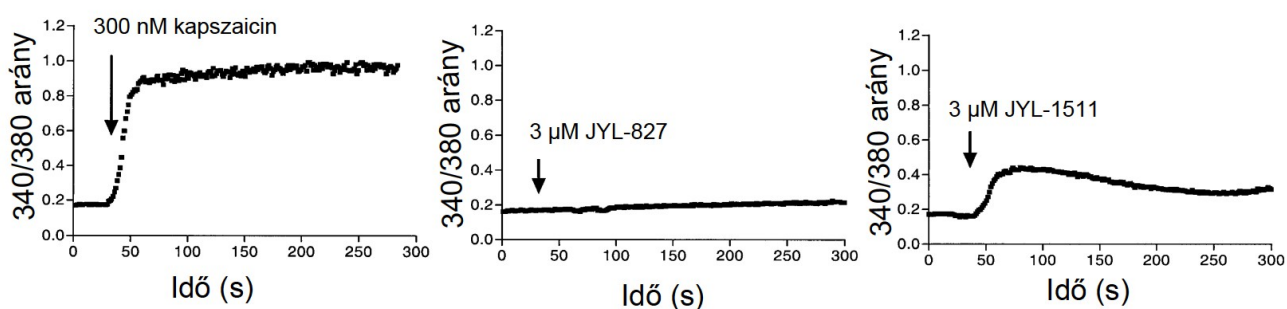
célzott vizsgálataink eredményeként a JYL-827 esetében is hasonló tulajdonságokat találtunk (C panel, 27. ábra). Mindkét vegyület képes volt a [^3H]RTX kötődését alacsony koncentrációban gátolni (JYL-1511: $50,4 \pm 16,5$ nM, JYL-827: $29,3 \pm 7,6$ nM, A panel, 27. ábra).



27. ábra: Parciális agonizmus / antagonizmus

A vegyületek hatását CHO-TRPV1 sejteken vizsgáltuk. A [^3H]RTX kötődés gátló hatást CHO-TRPV1 sejtek membránjához vizsgáltuk. Mindkét vegyület alacsony koncentrációban kötődött a TRPV1-hez (bal oldali ábra). A vegyületeket a funkcionális kísérletekben agonistaként (önmagukban) és antagonistaként (50 nM kapszaicinnal együtt alkalmazva) is teszteltük. Mindkét molekula esetében parciális agonizmust találtunk, habár a JYL-827 esetében az agonizmus igen alacsony mértékű volt (Wang et al. 2003).

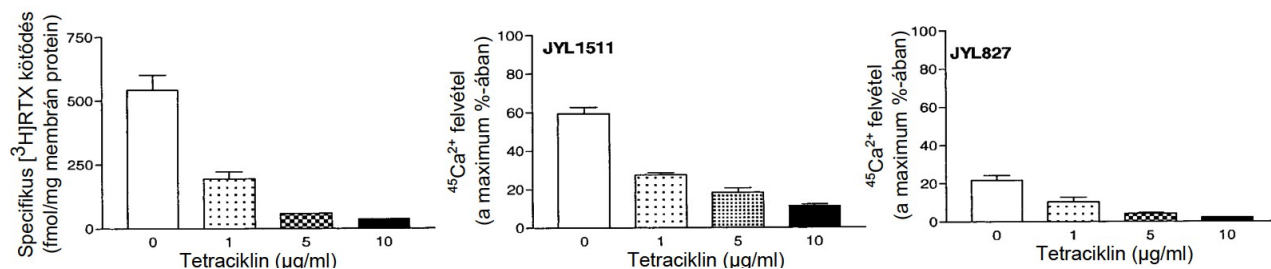
A vegyületek hatását az individuális sejtek intracelluláris Ca^{2+} mérésével is megerősítettük. A JYL-827 kisebb agonizmusával összhangban esetében kisebb intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedést kaptunk, mint a JYL-1511 esetében. Mindkét vegyület hatása elmaradt a kapszaicin hatásától.



28. ábra: Parciális agonizmus az individuális CHO-TRPV1 sejtek szintjén

A CHO-TRPV1 sejtek intracelluláris Ca^{2+} koncentrációjának mérésével is vizsgáltuk a vegyületeket. CHO-TRPV1 sejtekhez adtunk kapszaicint (kontrollként, 300 nM). A parciális agonistákat 3 μM koncentrációban alkalmaztuk, ami jelentősen meghaladta a [^3H]RTX kötődésben meghatározott K_i értéküket (Wang et al. 2003).

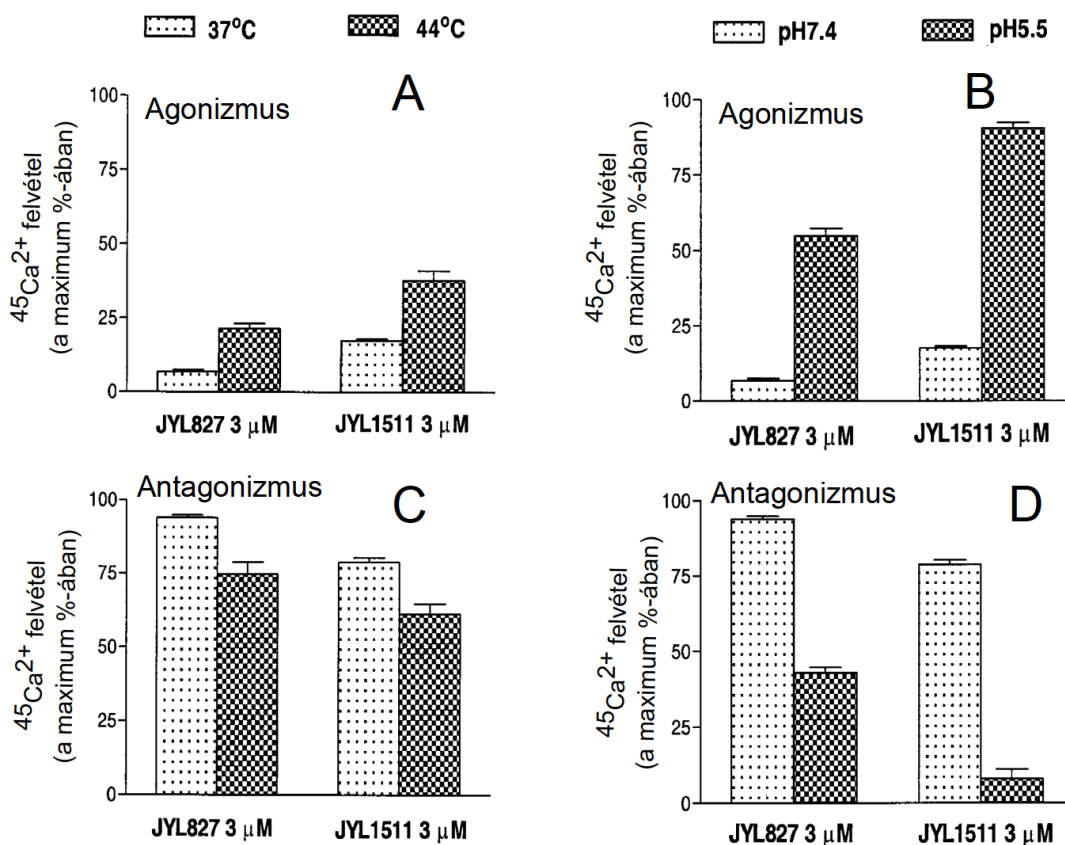
A parciális agonista hatást ezt követően a receptor környezetében található különböző modalitások változtatása mellett is meghatároztuk. A receptor expresszió növelésének hatására a vegyületek agonizmusa a funkcionális kísérletekben nőtt (29. ábra).



29. ábra: A TRPV1 expressziójának hatása a parciális agonizmusra

A TRPV1 expresszió a CHO sejtekben egy tetraciklin regulált módon expresszálódik: amennyiben a tetraciklin koncentráció alacsony, akkor a receptor expresszió emelkedik. Ennek ellenőrzésére [³H]RTX kötődést végeztünk (bal oldali ábra), amely kísérletben a maximális kötőképességet határoztuk meg. Ezt követően a TRPV1-et különböző szinten expresszáló sejteken vizsgáltuk a vegyületek hatásait (B és C panelek). Az y tengelyen a sejtek maximális ⁴⁵Ca²⁺ felvétele látható, amikor a ⁴⁵Ca²⁺-ot a tesztelt vegyületekkel együtt adtuk a sejtekhez (Wang et al. 2003).

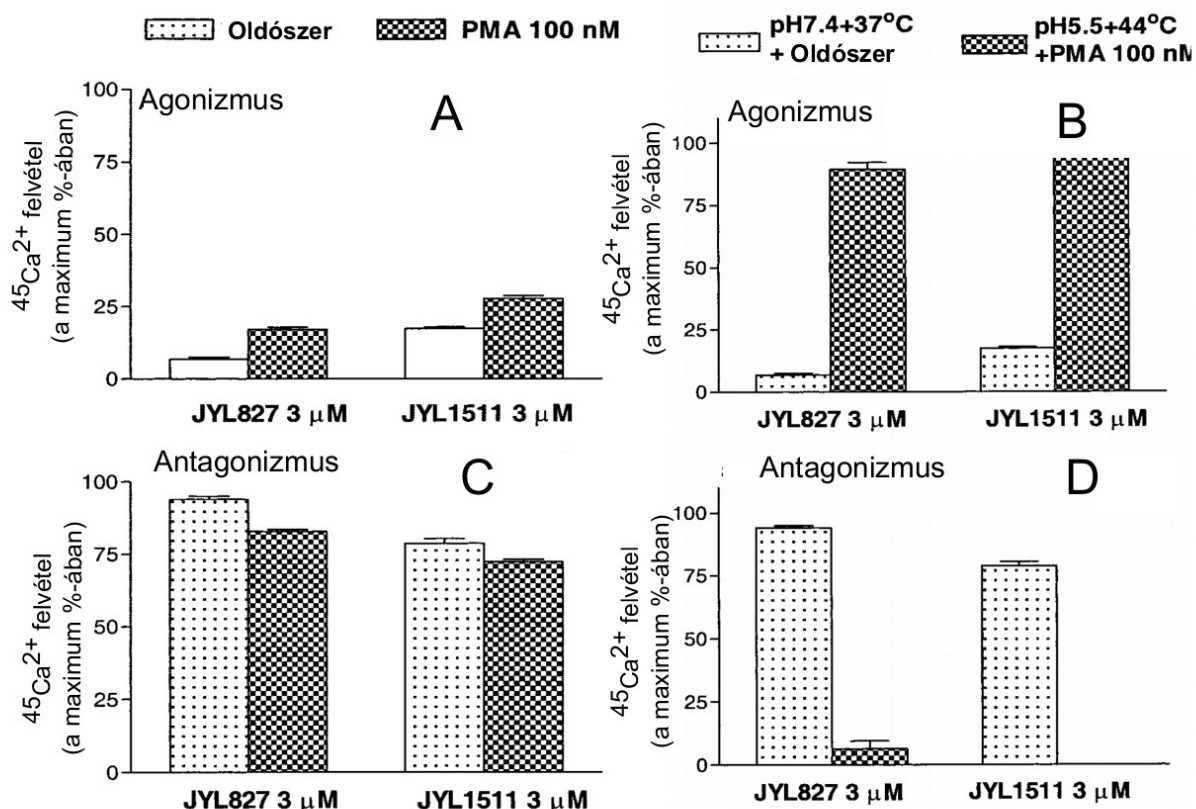
Vizsgáltuk a hőmérséklet és a pH hatását a receptor aktiválhatóságára a JYL-1511 és a JYL-827 esetében (30. ábra). A kísérletekben az agonizmust a vegyületek önmagában történő alkalmazása során kapott, a kezeletlen sejtekét meghaladó ⁴⁵Ca²⁺ felvétellel jellemeztük a 300 nM kapszaicin esetében kapott érték %-ában (agonista vizsgálatok, A és B panelek, 30. ábra), míg az antagonizmus vizsgálata esetében 50 nM kapszaicin hatásainak gátlását határoztuk meg (antagonista kísérletek, C és D panelek, 30. ábra). Összességében azt találtuk, hogy a hőmérséklet hatására (A és C panel, 30. ábra) mérsékelt eltolódás történik az agonizmus irányában, amely sokkal kifejezettebb a pH csökkentés esetében (B és D panelek, 30. ábra).



30. ábra: A hőmérséklet és a pH hatása a parciális agonizmusra / antagonizmusra

A parciális agonizmus mértékét olyan körülmények között is meghatároztuk, amelyekről ismertté vált, hogy befolyásolják a TRPV1 aktivitását. Így a JYL-1511 és a JYL-827 hatását magas hőmérsékleten és alacsony pH-n is vizsgáltuk. Felül az agonizmus, alul az antagonizmus látható (Wang et al. 2003).

Az utolsó kísérletsorozatban a receptort érzékenyítő PKC aktiváció hatását vizsgáltuk. Az adataink szerint a PKC aktiváció önmagában a parciális agonizmus kismértékű növekedéséhez vezetett (A és C panelek, 31. ábra). A receptort érzékenyítő hatásokat együtt alkalmazva (magas hőmérséklet, alacsony pH és PKC aktiváció) mindkét molekula esetében csaknem teljes agonizmust kaptunk (B és D panelek, 31. ábra).



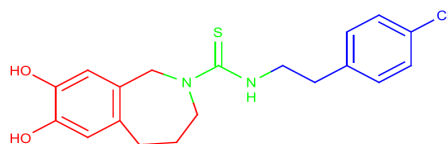
31. ábra: Parciális agonizmus mértéke PKC aktiváció jelenlétében

Az agonizmus és az antagonizmus meghatározását PMA jelenlétében és végül a hő, pH és PMA hatását egyszerre is vizsgáltuk (Wang et al. 2003).

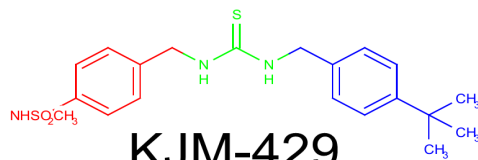
3.2.2. TRPV1 antagonisták: vezérmolekulák és modalitás a hatékonyságban

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 (piros, 32. ábra), mind a „C” régióban (kék, 32. ábra) optimalizálni igyekeztünk. Az „A” régióban a benzolgyűrűhöz a vanilloidokban megtalálható fenolos hidroxilcsoport helyettesítésére metánszolfonamid 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 (flour) beépítése is megtörtént.

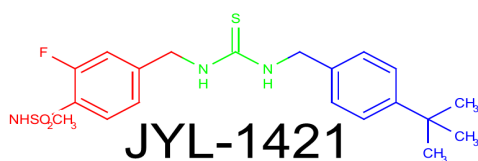
dc_652_12



Capsazepine



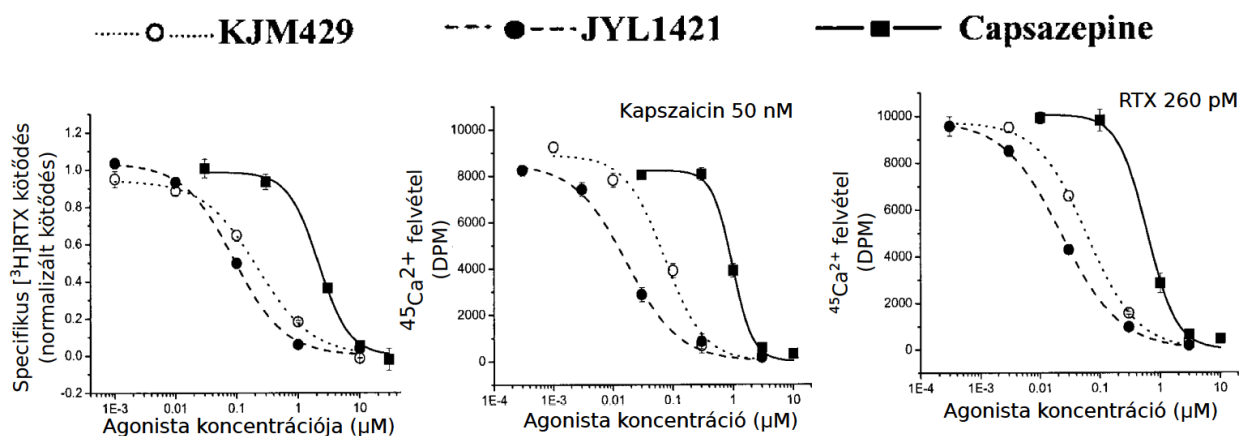
KJM-429



JYL-1421

32. ábra: A KJM-429 és a JYL-1421 szerkezete

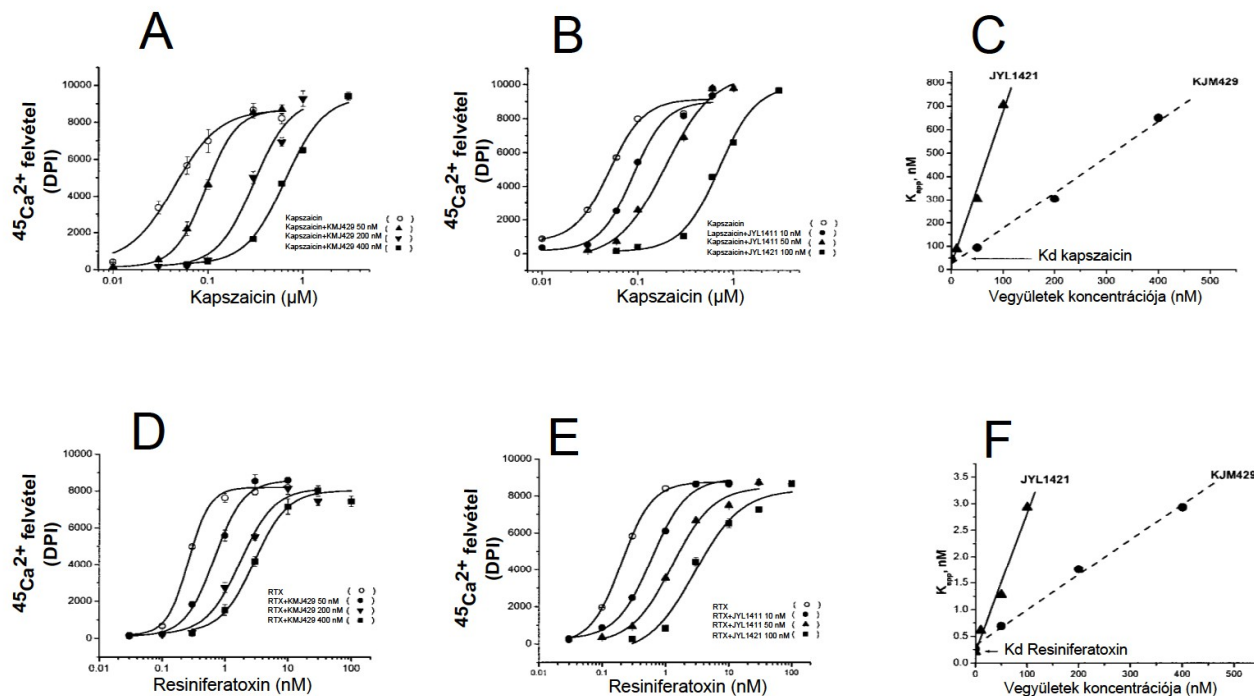
A vegyületekkel kapott eredményeink rendkívül kedvezőek voltak. A JYL-1421 $53,5 \pm 6,5$ nM-os hatékonysággal kötődött a TRPV1-hez, és a funkcionális kísérletekben $9,2 \pm 1,6$ nM-os hatékonysággal gátolta a TRPV1-en keresztüli $^{45}\text{Ca}^{2+}$ beáramlást (33. ábra).



33. ábra: A JYL-1421 és a KJM-429 hatása a TRPV1-re

A JYL-1421 és a KJM-429 kötődését CHO-TRPV1 sejtek membránjában található receptorokhoz vizsgáltuk (bal oldali ábra), amikor 50-100 pM [^3H]RTX kötődésének gátlása alapján határoztuk meg a K_i értéküket. A funkcionális tulajdonságok vizsgálatához kapszaicin (középső grafikon) és resiniferatoxin (jobb oldali grafikon) által indukált $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvétel gátlását használtuk (Wang et al. 2002).

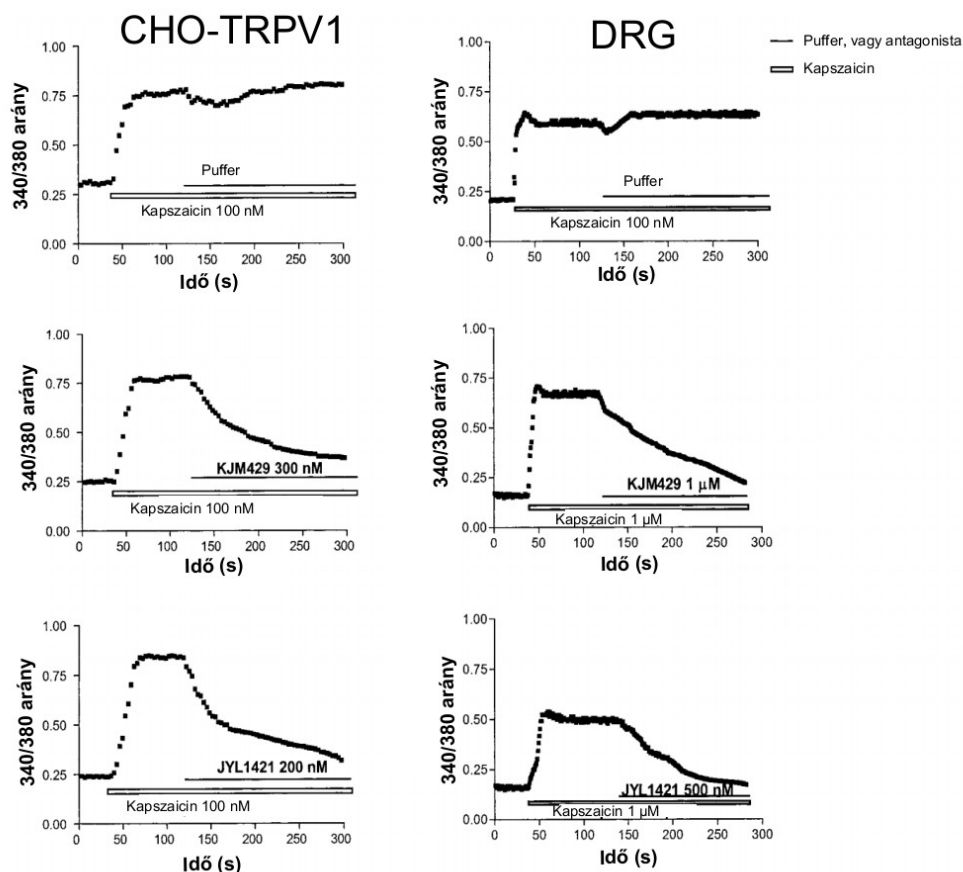
A JYL-1421 és a KJM-429 farmakológiai tulajdonságait részletesen vizsgáltuk. Mindkét vegyület kompetitív módon gátolta a kapszaicin és resiniferatoxin funkcionális hatásait CHO-TRPV1 sejteken (34. ábra).



34. ábra: A KJM-429 és a JYL-1421 mint TRPV1 antagonisták

A KJM-429 és a JYL-1421 hatásait CHO-TRPV1 sejteken vizsgáltuk a $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvétel alapján. Az antagonistákat növekvő koncentrációban adtuk a sejtekhez, majd 15 perc inkubációt követően a sejtekhez kapszaicint (felső grafikonok) vagy resiniferatoxint (alsó grafikonok) adtunk. A látszólagos stabilitási állandók alapján a kötődésük kompetitívnek bizonyult és a stabilitási állandójukat is pontosan meg lehetett határozni (jobb oldali grafikonok) (Wang et al. 2002).

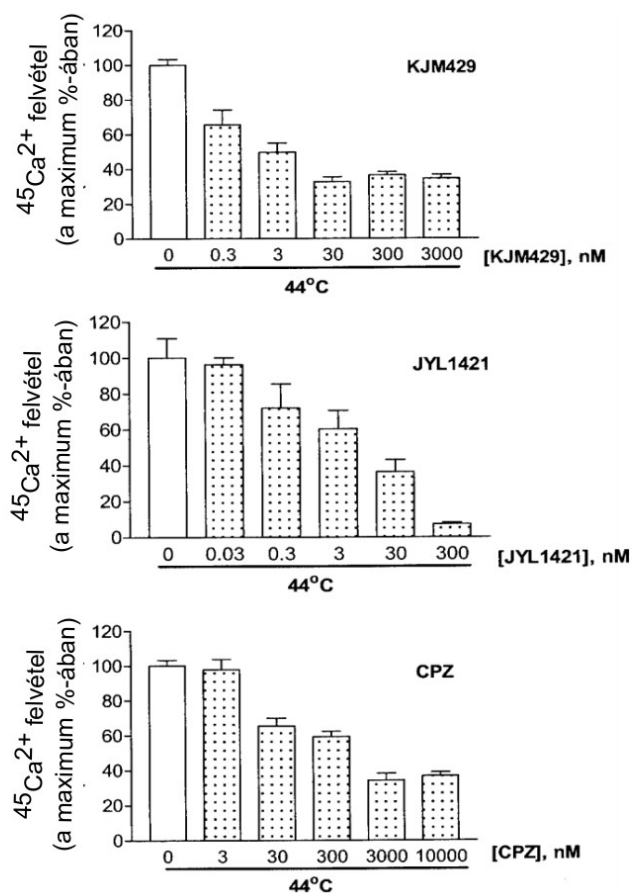
Az alapvető farmakológiai tulajdonságok meghatározását követően a vegyületek részletes analízisével folytattuk munkánkat. Ennek során intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változásával követtük hatékonyságukat mind a heterológ rendszerben expresszált TRPV1 esetében, mind a patkány hátsógyöki ganglionokból izolált és tenyésztett idegsejtek esetében (35. ábra). Adataink szerint mindkét vegyület képes volt a kapszaicin által kiváltott intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedést gátolni.



35. ábra: A KJM-429 és a JYL-1421 hatékonysága az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változás szintjén

A KJM-429 és a JYL-1421 hatásait az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációra mind CHO-TRPV1 sejteken (bal oldali grafikonok), mind izolált hátsógyöki ganglionokból izolált sejteken (DRG, jobb oldali grafikonok) teszteltük. Mindkét sejt típusban először 100 nM kapszaicin adtunk, aminek hatására az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció megemelkedett, és azt a 90 másodperccel később adott puffer nem befolyásolta (felső grafikonok). Ezzel ellentétben a KJM-429 (középső grafikonok), mind a JYL-1421 (alsó grafikonok) jelentősen csökkentette a kapszaicin hatását (Wang et al. 2002).

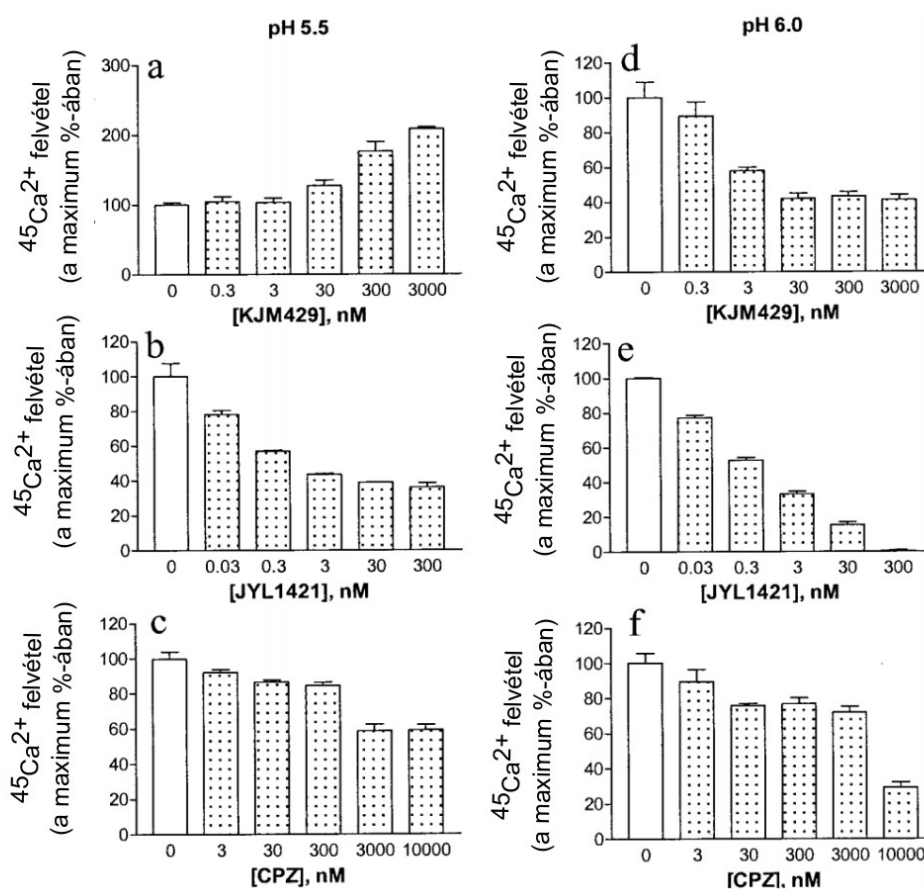
A vegyületek hatékonyságát a továbbiakban megvizsgáltuk magasabb hőmérsékleten is. A kapott eredmények szerint a capsazepine (CPZ, 36. ábra) és a KJM-429 esetében a magasabb hőmérsékleten a gátlás részlegessé vált. A JYL-1421 esetében a molekula magasabb hőmérsékleten is teljes mértékben gátolta a TRPV1-et (36. ábra).



36. ábra: A hőmérséklet hatása a KJM-429 és a JYL-1511 antagonisták hatáserejére

Ezt követően a parciális agonista molekulák jellemzésénél használt protokoll szerint vizsgáltuk a hőmérséklet hatását az antagonisták hatékonyságára. Az aktivitást $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvétel alapján számszerűsítettük, CHO-TRPV1 sejteket felhasználva. 44 °C-on a KJM-429 (felső grafikon) csak részlegesen volt képes gátolni a TRPV1-et, a capsazepinehez (CPZ, alsó grafikon) hasonlóan, míg a JYL-1421 (középső grafikon) gátló hatása nem változott (Wang et al. 2002).

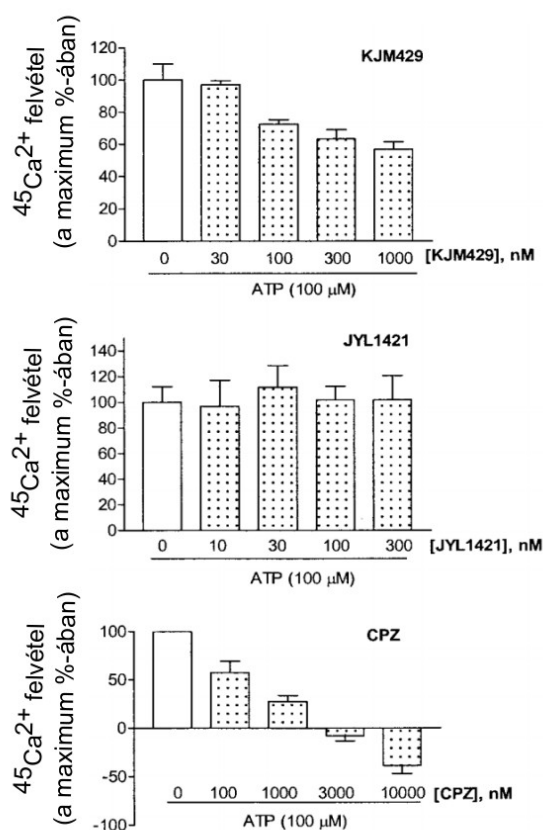
Vizsgáltuk a pH csökkenésének hatását a vegyületek hatékonyságára. A kapott adatok szerint a KJM-429 a pH csökkenésével párhuzamosan fokozódó agonista hatással bírt a CHO sejtekben expresszált TRPV1-re. A másik két vegyület esetében a capsazepine részleges gátlást mutatott és a JYL-1421 ilyen körülmények között is képes volt jelentősen gátolni a receptort (37. ábra).



37. ábra: A pH csökkenésének hatása a TRPV1 antagonisták hatékonyságára

A KJM-429 (felső grafikonok), a JYL-1421 (középső grafikonok) és a capsazepine (CPZ, alsó grafikonok) hatékonyságát CHO-TRPV1 sejtek $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvételére a alacsony pH (pH=5,5 a bal oldali grafikonok és pH=6,0 a jobb oldali grafikonok esetében) mellett is vizsgáltuk. A kísérletekben kapott $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvételt az adott körülmények között antagonistát nem tartalmazó kísérletekben mért értékek százalékában fejeztük ki (Wang et al. 2002).

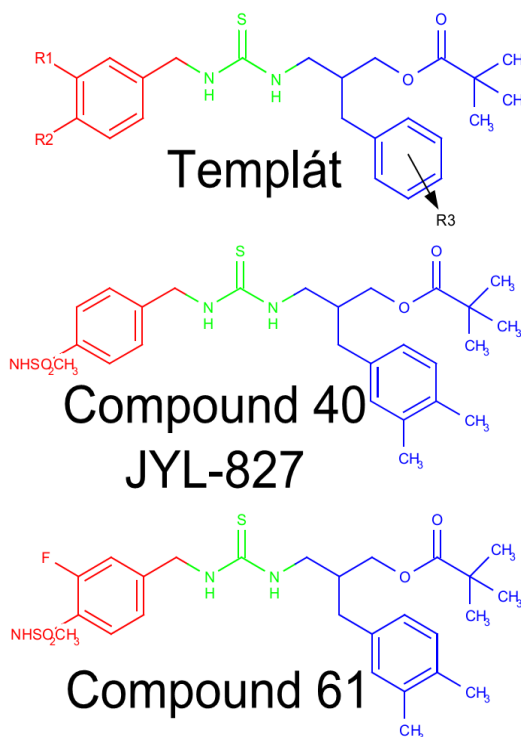
Végül a kísérletekben választ kerestünk arra a kérdésre is, hogy mi állhat a capsazepine és az általunk fejlesztett TRPV1 antagonisták hatékonyságában megfigyelhető különbségek hátterében. Eredményeink arra utaltak, hogy a capsazepine az ATP által kiváltott hatásokat is gátolta, míg a JYL-1421 ezt nem tette. Ez arra utalt, hogy a capsazepine szelektivitása nem kellő mértékű ebben a rendszerben (38. ábra).



38. ábra: A TRPV1 antagonisták specifikitása

Az KJM-429 (felső grafikon), JYL-1421 (középső grafikon) és a capsazepine (CPZ, alsó grafikon) hatékonyságát 100 μM ATP által kiváltott $^{45}\text{Ca}^{2+}$ beáramlásra is meghatároztuk CHO sejteken. Az adatokat a 100 μM ATP jelenlétében mért $^{45}\text{Ca}^{2+}$ beáramlás százalékában fejeztük ki (Wang et al. 2002).

Az optimális vezérmolekula kialakítása érdekében a capsazepine tiourea „B” régiója mellett a molekula „A” és „C” régiójában is történtek módosítások (39. ábra). 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 (27. ábra).



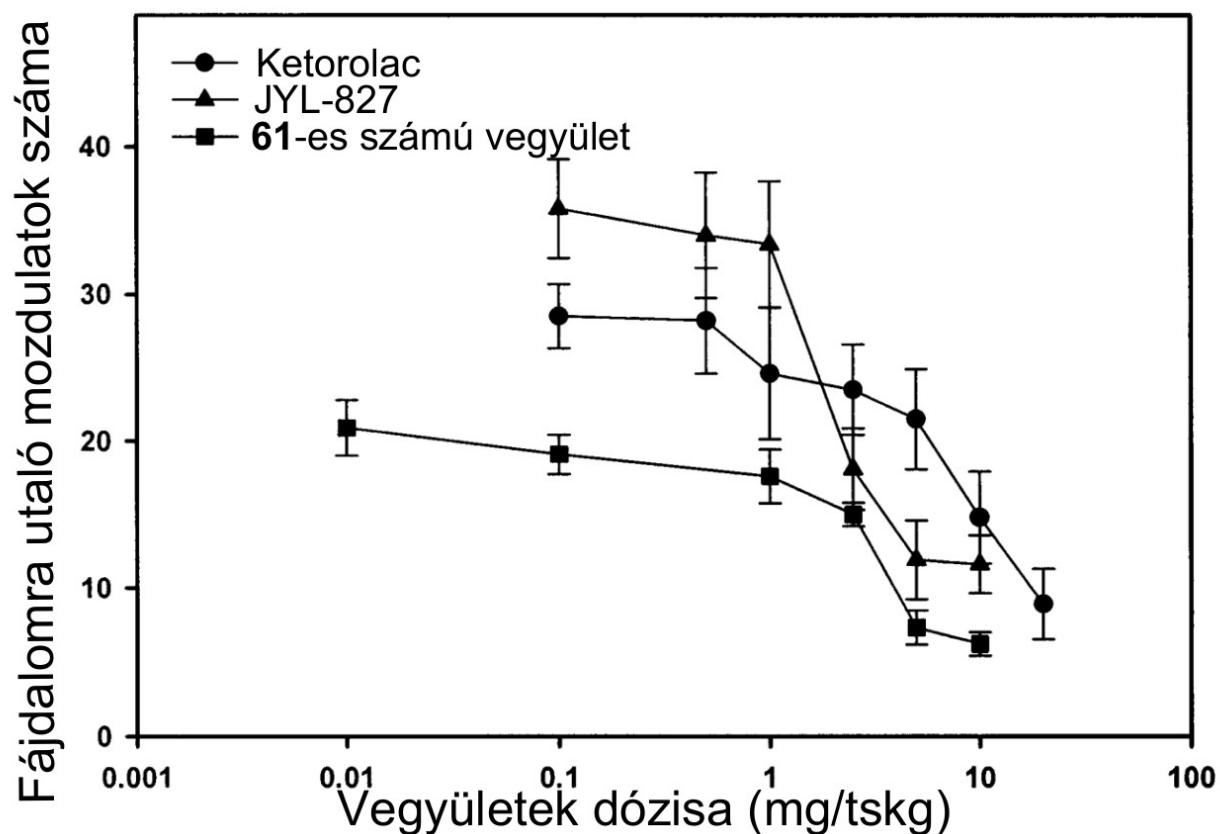
39. ábra: TRPV1 antagonisták: tiourea származékok

A molekulászerkezetek számozása (Lee et al. 2003) szerint történt.

A különböző molekuláris struktúrák vizsgálata során a vezérmolekulához képest sikerült előrelépést tenni az antagonista hatékonyságában. Az előrelépést a JYL-1421 vegyület esetében bemutatott „A” régiónak a létrehozása jelentette (32. ábra), melyet a JYL-827-ben bevezetett „C” régióval kombináltunk. Az így nyert **61**-es számú vegyület (39. ábra) 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.

Az eddigi *in vitro* kísérletek fontos kiegészítését jelentette, hogy kollaborációs partnerünk a leghatékonyabbnak bizonyuló vegyületeket (JYL-827 és **61**-es számú vegyület) *in vivo*

kísérletekben is vizsgálta (Lee et al. 2003). Itt az ecetsav által kiváltott fájdalom (writhing) modellben ellenőrizték a vegyületek hatékonyságát, és azt találták, hogy az eléri a kontroll analgetikumként használt ketorolac hatékonyságát (40. ábra).



40. ábra: TRPV1 antagonisták *in vivo* hatékonysága

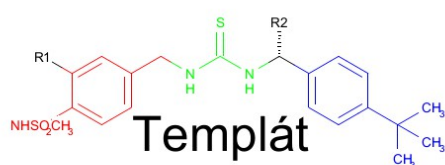
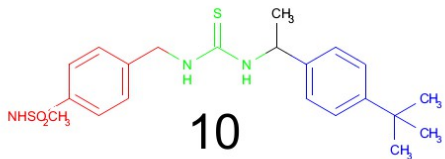
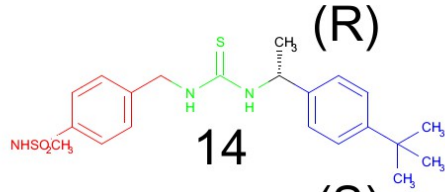
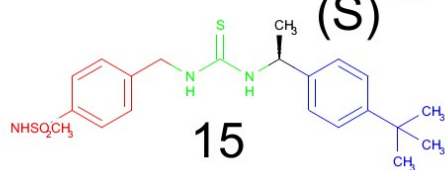
(Lee et al. 2003) alapján.

3.3.3. Molekulafejlesztés

Erőfeszítést tettünk az „A” régió (7. ábra) 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 (41. ábra). 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 (41. ábra).

 Templát	[³ H]RTX kötődés Ki (nM)	⁴⁵ Ca ²⁺ felvétel antagonizmus (nM)
 10	59	15
 (R) 14	41	5
 (S) 15	Nincs	3950

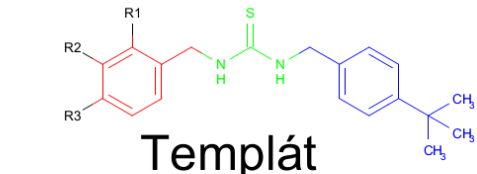
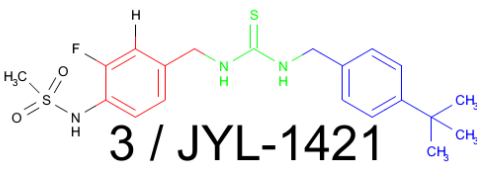
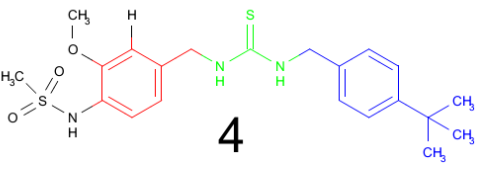
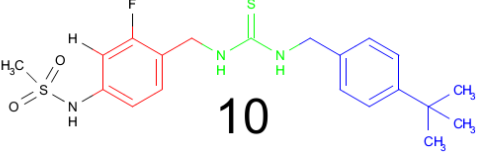
41. ábra: Sztereospecifikus módosítások az alfa szénatomon

A molekulaszervezetek számozása (Chung et al. 2007) szerint történt.

Egy tanulmányban részletesen elemeztük az „A” régióban a metánszulfonamid csoportok mellett más szubsztitúciók jelentőségét (Lee et al. 2005). Eredményeink szerint a 2-es pozícióban

dc_652_12

lévő H, vagy F lecserélhető hidroximetil csoportra amely szubsztitúció javítja az antagonistát hatást. Mindemellett az is világossá vált, hogy a benzol gyűrű 1-es pozíciójában elvégzett szubsztitúciók kevésbé érintik a molekulák hatékonyságát (42. ábra).

Templát	[³ H]RTX kötődés Ki (nM)	⁴⁵ Ca ²⁺ felvétel antagonizmus (nM)
 2 / KMJ-429	63	54
 3 / JYL-1421	54	9
 4	50	3
 10	215	27

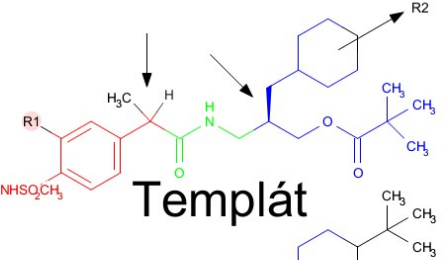
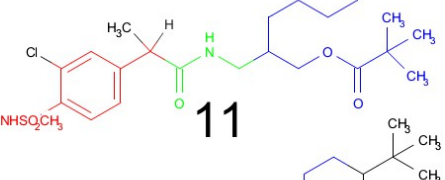
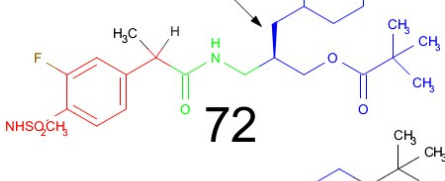
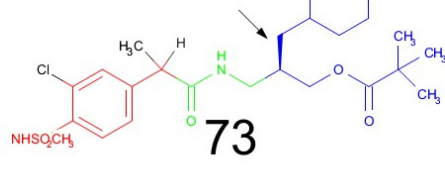
42. ábra: Az „A” régió optimalizálása: szubsztitúciók az 1-es és 2-es pozíciókban

A molekulaszervezetek számozása (Lee et al. 2005) szerint történt.

Az „A” régió szerkezetének összefüggéseit vizsgáltuk a „B” és „C” régiókban található királis szénatomokhoz sztereospecifikusan kapcsolt ligandokkal (43. ábra). Mint az a templát szerkezetéből is látható, 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 (39. ábra) 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

dc_652_12

tudtuk vizsgálni. Eredményeink szerint a „B” régió módosítása pozitívan érintette a molekulák farmakológiai tulajdonságait a tiourea templáthoz képest (39. ábra) a racém vegyületeket tekintve (11-es molekula, 43. ábra). Az ábrán nyíllal jelölt kiralitáscentrumok szerinti sztereokémiai optimalizálás eredményeképpen a racém elegy inaktív komponensének eliminálásával sikerült további kétszeres növekedést elérni az hatékonyságban (11-es vs. 73-as vegyület, 43. ábra). Mi több, az „A” régióban a klorid fluoriddal történő helyettesítése képes volt ezen sztereospecifikus ligand hatékonyságát tovább növelni (72-es molekula, 43. ábra). Az optimalizálás eredménye egy pikomoláris tartományban aktív, az amid csoporton kívül más nyilvánvalóan metabolikusan érzékeny régiót nem tartalmazó, viszonylag egyszerű szerkezetű TRPV1 antagonistá lett.

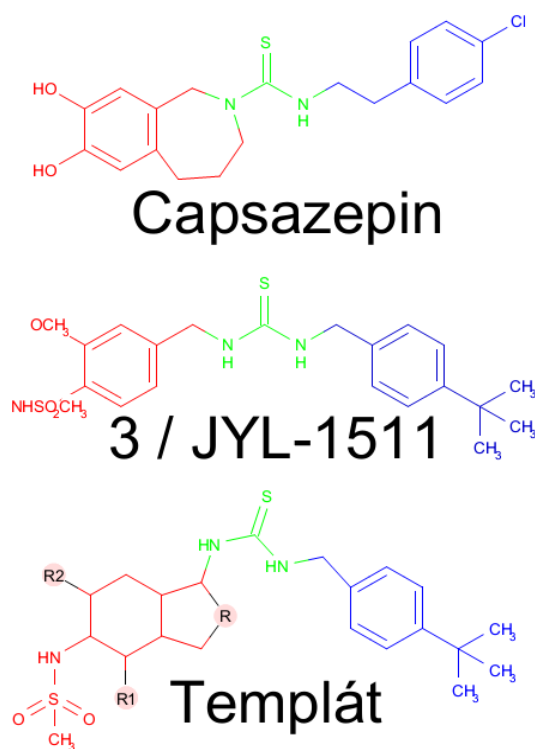
Templát	[³ H]RTX kötődés K _i (nM)	⁴⁵ Ca ²⁺ felvétel antagonizmus (nM)
		
 11	4	12
 72	4	0,6
 73	2	5

43. ábra: TRPV1 antagonisták optimalizálása a "B" régióban és sztereospecifikus szintézissel
A molekulaszervezetek számozása (Ryu et al. 2008) szerint történt.

Egy kísérletsorozatban próbálkoztunk azzal is, hogy az „A” régió és a „B” régió egymáshoz

dc_652_12

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. Az alapvegyületeket és az a tesztelt vegyületek templátját a 44. ábra mutatja.



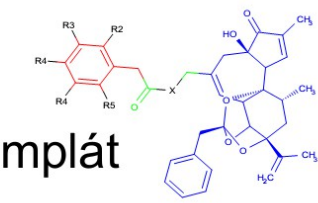
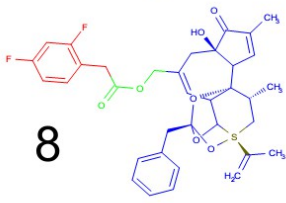
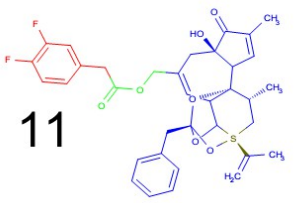
44. ábra: Az "A" és "B" régió egymáshoz viszonyított helyzetének rögzítése

A molekulaszerkezetek számozása (Lim et al. 2009) szerint történt.

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 (45. ábra). A

dc_652_12

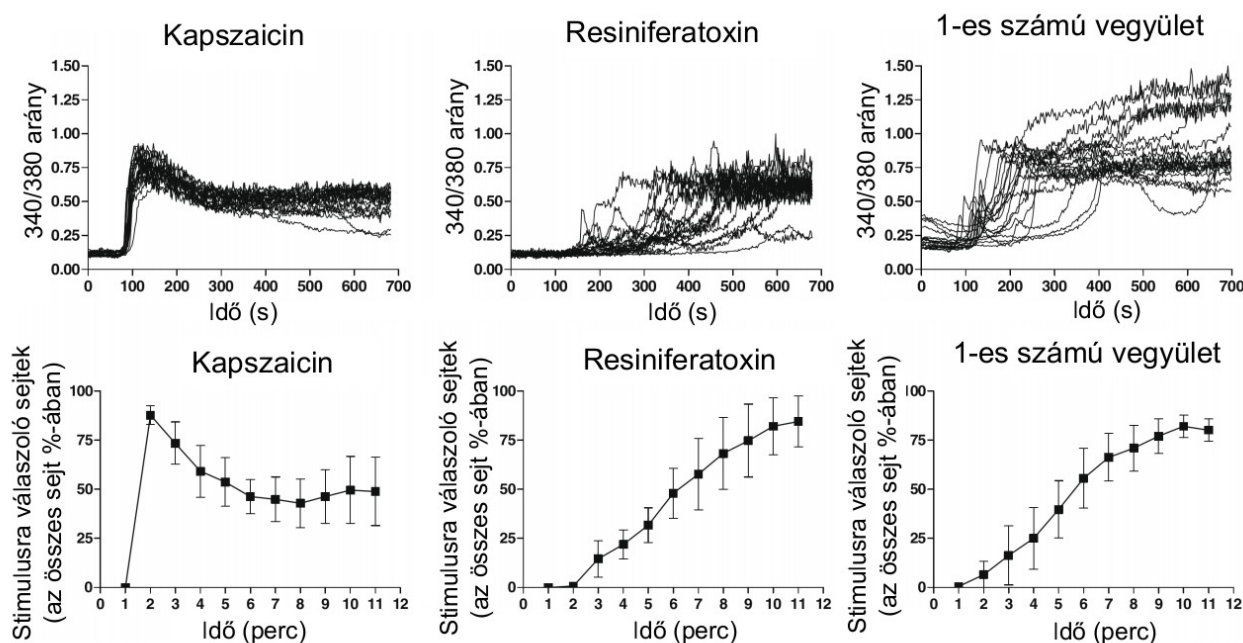
leghatékonyabb vegyület (1-es számú vegyület) hatékonysága a funkcionális mérésekben meghaladta a resiniferatoxin hatékonyságát is.

Templát	[³ H]RTX kötődés Ki (nM)	⁴⁵ Ca ²⁺ felvétel agonizmus (nM)
 1	0,2	0,1
 8	0,9	1,8
 11	1,0	5,5

45. ábra: Resiniferatoxin alapú struktúrák "A" régiójának halogenálása

A molekulaszervezetek számozása (Choi et al. 2009) szerint történt.

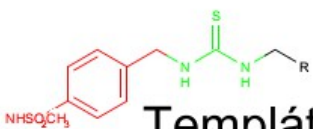
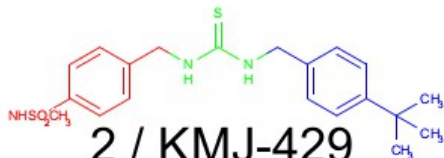
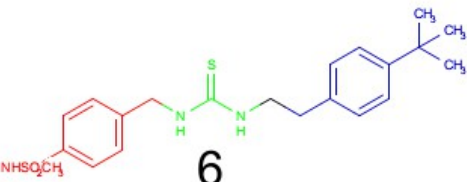
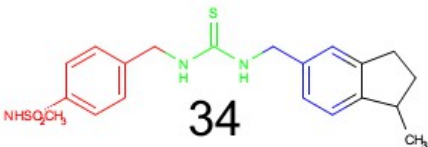
Az 1-es számú vegyület CHO-TRPV1 sejtekre gyakorolt hatásait behatóan is tanulmányoztuk. Intracelluláris Ca²⁺ koncentráció mérésekkel kimutattuk, hogy az individuális sejtek Ca²⁺ válasza nagyon hasonló a resiniferatoxinnal kiváltott válaszokhoz, amennyiben a sejtek nem egyszerre válaszolnak, amikor viszont az individuális sejtek intracelluláris Ca²⁺ szintje megemelkedik, akkor az mindenképpen eléri a lehetséges emelkedés maximumát és az nem csökken (nincs deszenzibilizáció) (46. ábra). A kapszaicinnel kapott adataink egy fordított állapotra utalnak.



46. ábra: Individuális CHO-TRPV1 sejtek válasza a különböző agonistákkal végzett kezelésekre

CHO-TRPV1 sejteket kezeltünk kapszaicinnal (bal oldali grafikonok), resiniferatoxinnal (középső grafikonok) és az 1-es számú vegyülettel (45. ábra). A felső grafikonokon az egy látótérbe eső összes sejtről rögzített intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változások láthatóak, míg az alsó grafikonokon a maximális intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedés legalább 10%-át elérő sejtek százalékos aránya látható (Choi et al. 2009).

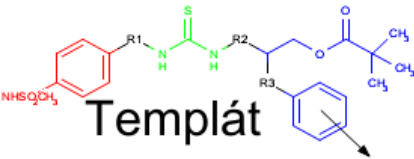
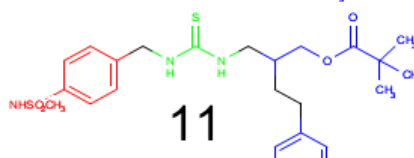
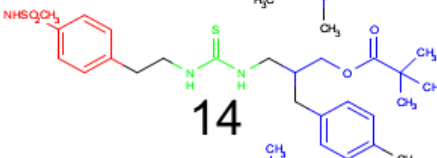
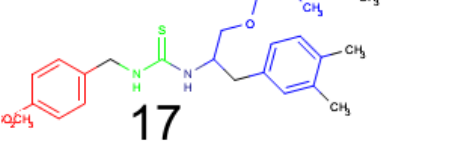
A KJM-429 (32. ábra) sikere alapján erőfeszítések történtek a „C” régió módosításával növelni a molekulák hatékonyságát. Ennek egyik eleme a „B” régió és a „C” régió benzolgyűrűje közötti szakasz optimális hosszának meghatározása volt (47. ábra). A „B” régió és a tercier butil-fenil csoport közötti távolság 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 (47. ábra), mint a szerkezetekben általunk gyakran használt tercier-butil-fenil csoport (Lee et al. 2004).

 Templát	$[^3\text{H}]\text{RTX}$ kötődés Ki (nM)	$^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvétel antagonizmus (nM)
 2 / KMJ-429	63	54
 6	1260	242
 34	359	66

47. ábra: A "C" régió funkcionális csoportjai közötti optimális távolság meghatározása

A molekulaszervezetek számozása (Lee et al. 2004) szerint történt.

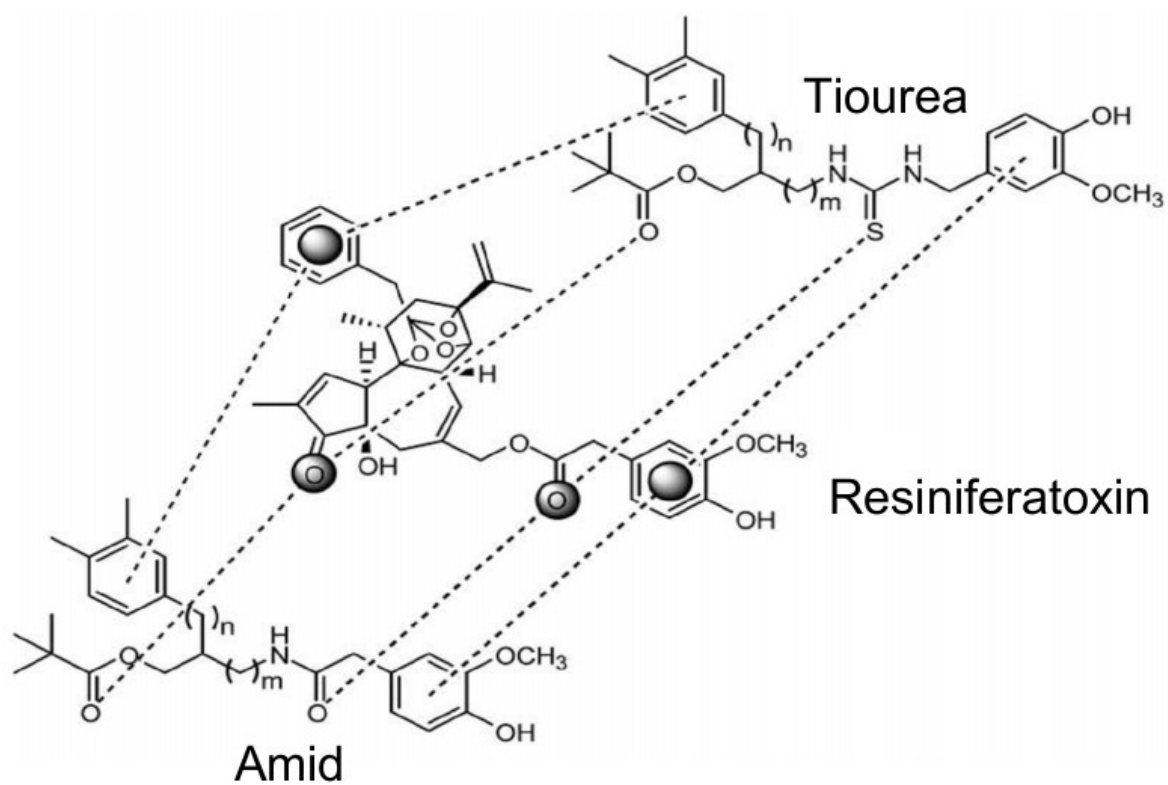
A tiourea templát felhasználásával vizsgáltuk az „A” és a „B” régióban az aromás csoportok „B” régiótól való optimális távolságát (48. ábra). A kapott eredmények szerint az aromás csoportok távolsága erősen kötött a molekulákban. Egy-egy szénatom távolsággal megnyújtva a molekulák TRPV1 iránti hatékonysága 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, 48. ábra).

Templát	[³ H]RTX kötődés Ki (nM)	⁴⁵ Ca ²⁺ felvétel antagonizmus (nM)
 1 / JYL-827	29	67
 11	1430	121
 14	1850	790
 17	580	Nincs

48. ábra: Az aromás csoportokat tartalmazó "A" és "C" régiók optimális távolsága a tiourea összekötő régiótól

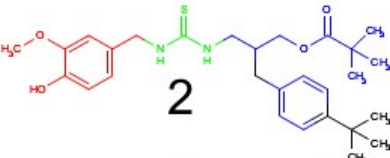
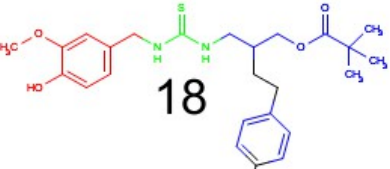
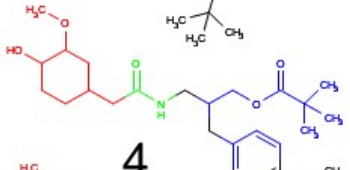
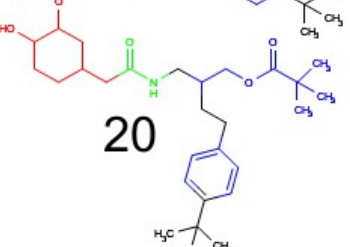
A molekulaszervezetek számozása (Lee et al. 2004) szerint történt.

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 (templátok, 49. ábra).



49. ábra: Agonista templát az optimális "C" régió feltérképezése érdekében

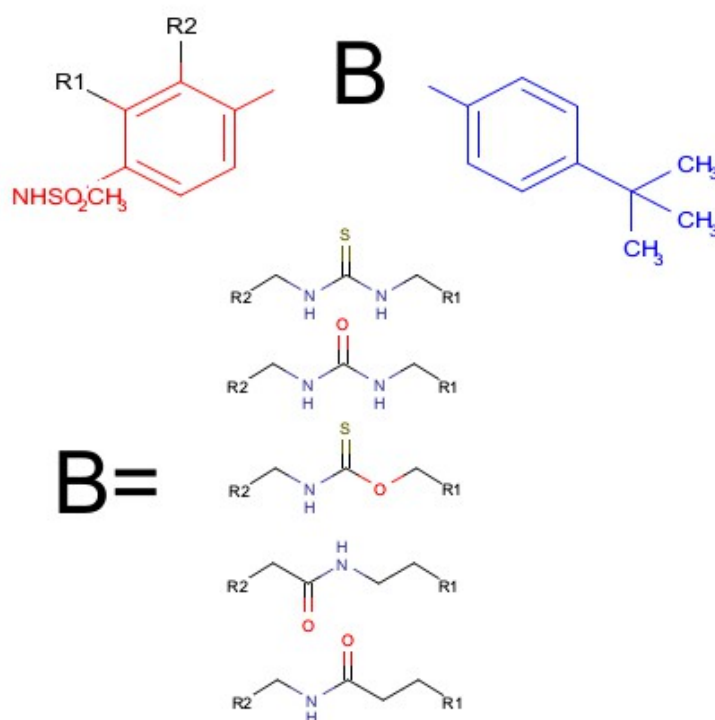
A TRPV1-hez való kötőképesség és az agonizmus sem változott jelentősen (50. ábra).

	[³ H]RTX kötődés Ki (nM)	⁴⁵ Ca ²⁺ felvétel agonizmus (nM)
 2	6	3
 18	18	19
 4	15	0,3
 20	36	8

50. ábra: A "C" régió optimális hossza a tecier-butyl-fenil oldallánccal rendelkező vegyületekben

A molekulaszervezetek számozása (Lee et al. 2004) szerint történt.

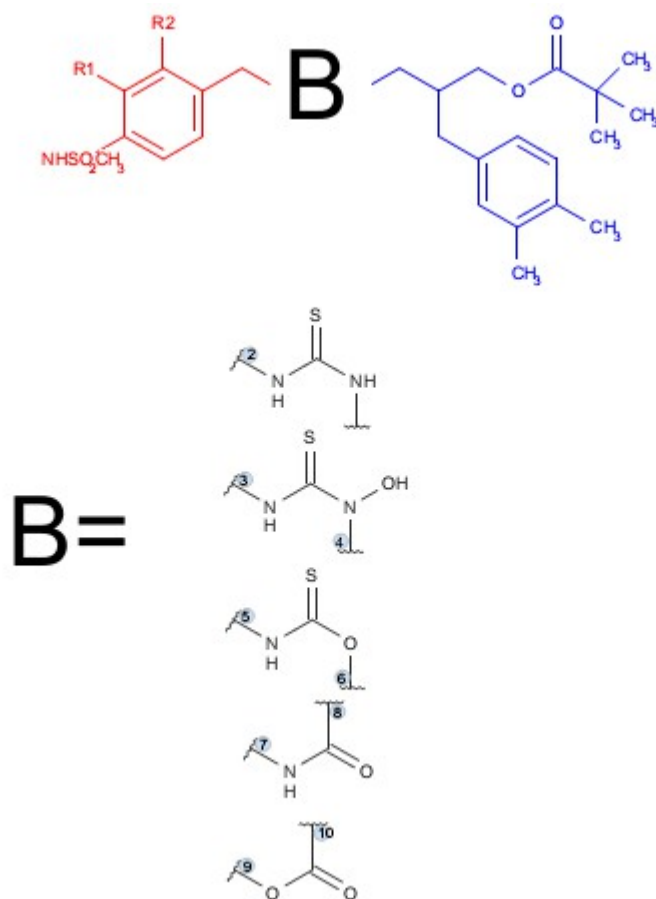
A „B” régiót gyakran a szintetikus vegyész életét megkönnyítő, két reakcióképes funkciós csoport összekapcsolódásának helyeként tekintjük. A „B” régiónak ennek ellenére nagy szerepe lehet a TRPV1-en való hatékonyság meghatározásában. Bizonyos értelemben a „B” régió mellett található szénláncok optimális hosszának vizsgálata is ezt a kérdést feszegette (50. ábra). 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 (51. ábra). Eredményeink szerint a „B” régióban található módosítások minden esetben előnytelen konformációváltozásokhoz vezettek, és az atomok sorrendjének megcserélésével sem tudtunk a



51. ábra: A "B" régió módosításai

A molekulaszerkezetek számozása (Lee et al. 2005) szerint történt.

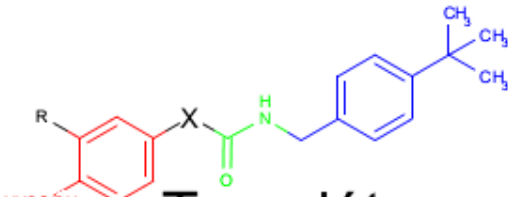
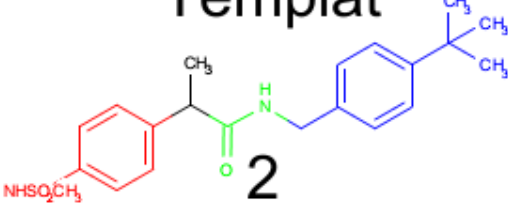
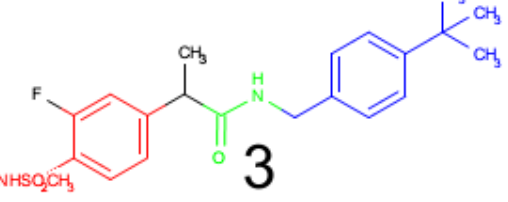
A „B” régió optimalizálásánál továbbá újabb templátokat is vizsgáltunk, amelyek segítségével további információkat nyertünk az optimális ligandok térszerkezetéről és a kívánatos elektron eloszlásról (52. ábra). Az adatok szerint a vizsgált „A” és „C” régiók mellett az újabb csoportok beépítésével nem sikerült a TRPV1 iránti hatékonyságot növelni, jóllehet a hidroxitiourea 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).



52. ábra: Módosítások a "B" régióban

A molekulaszerkezetek számozása (Lee et al. 2004) szerint történt.

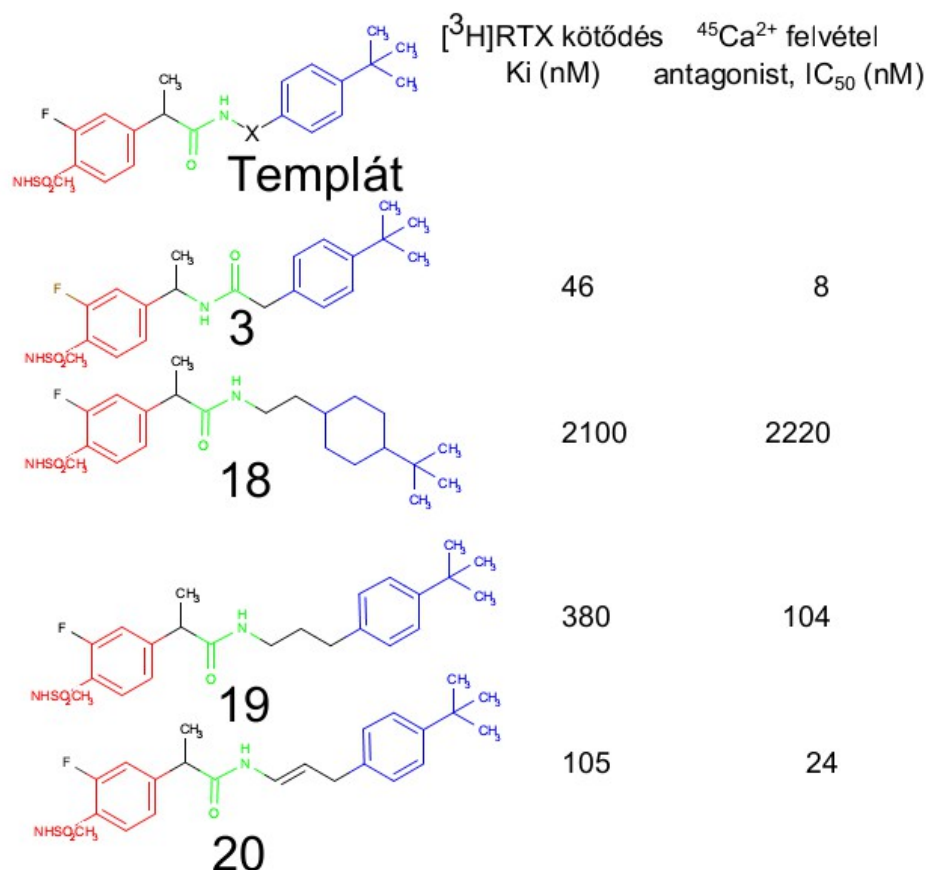
Végül, a „B” és „C” régiókban további struktúrákat is teszteltünk. A kísérletek egyik célja a „B” régióban kettős kötésekkel modulált atomtávolságok alapján közelebbi adatokat nyerni az optimális távolságokról ezúttal az amid templát felhasználásával (53. ábra). Figyelemreméltó volt, hogy a propánamid régió esetében a hatékonyság megtartott maradt.

	$[^3\text{H}]\text{RTX}$ kötődés Ki (nM)	$^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvétel antagonist, IC_{50} (nM)
 Templát	106	17
 2	46	8
 3		

53. ábra: A "A-B" régió optimalizálása: propánamidok kialakítása

A molekulaszervezetek számozása (Ryu et al. 2008) szerint történt.

Ezt követően a terc-butil-fenil csoport optimális távolságát határoztuk meg a propánamid csoporttól (54. ábra). 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).



54. ábra: A tercier-butil-fenil csoport optimális távolsága a propánamid "B" régiótól

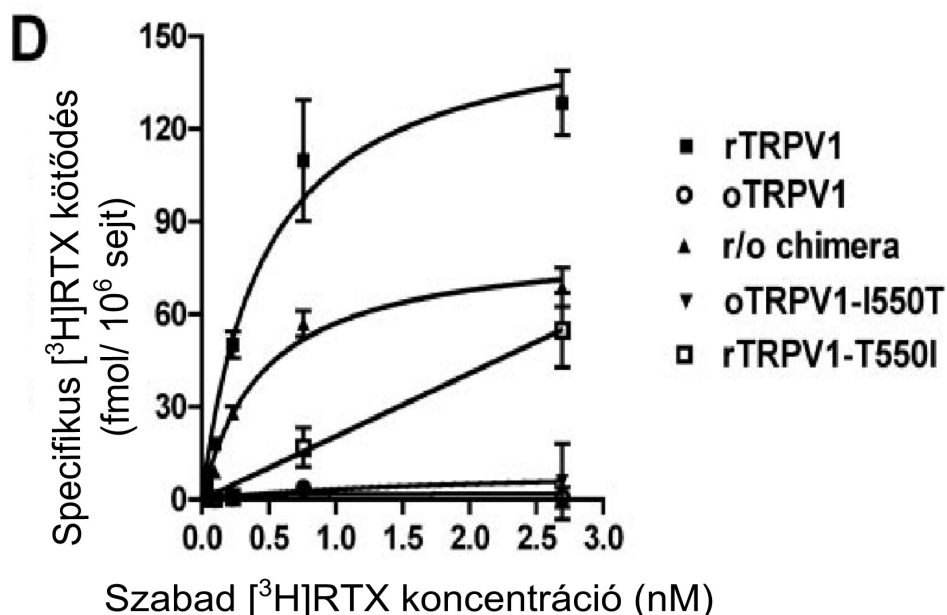
A molekulaszerkezetek számozása (Sun et al. 2012) szerint történt.

3.3. 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 előállítása). A teljes munkában az én feladatom [³H]RTX kötődési kísérletek végzésében merült ki, így itt 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 (55. ábra). 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 érzékenységét nem javította, azonban a patkányban a fordított irányú csere jelentősen csökkentette a [^3H]RTX kötő képességet (55. ábra).



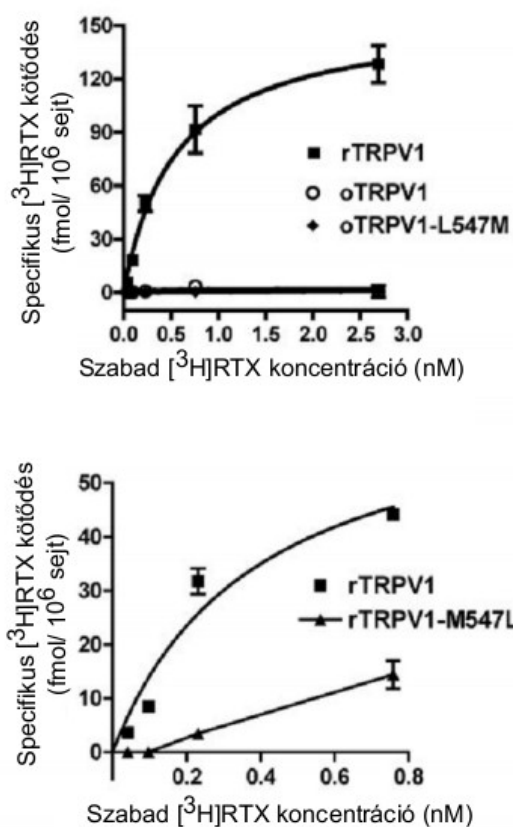
55. ábra: Nyúl-patkány TRPV kimérák vanilloid kötése

(Gavva et al. 2004) alapján.

dc_652_12

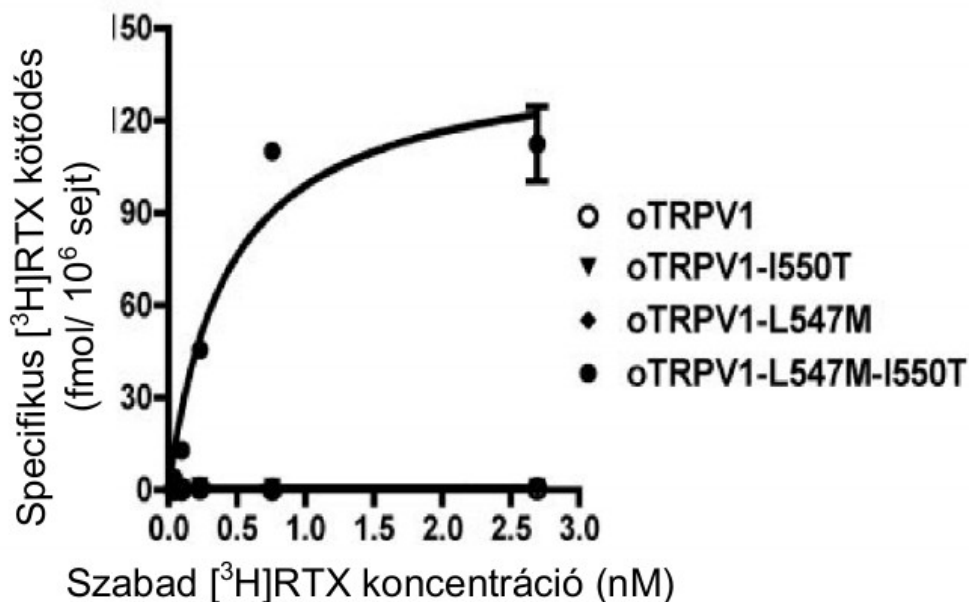
A következő mutált aminosav az 547-es volt, amely nyúlban lizin, patkányban metionin.

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 (56. ábra).



56. ábra: Az 547 metionin szerepe a vanilloid kötésben a patkány TRPV1-ben
(Gavva et al. 2004) alapján.

Akkor azonban, amikor mindkét fentebb említett aminosavat mutálták, a nyúl TRPV1 képessé vált a vanilloidok kötésére (57. ábra).



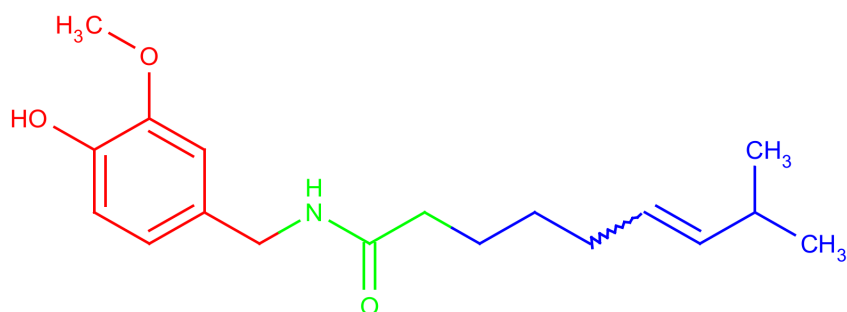
57. ábra: A nyúl 547-550 kettős TRPV1 muntáns vanilloid érzékenysége megközelíti a patkány TRPV1-ét

(Gavva et al. 2004) alapján.

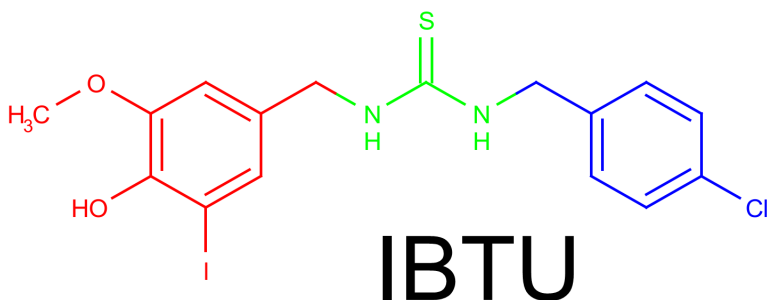
3.4. Modalitások a TRPV1 kapszaicin kötő helyén

Mint az az előzőekből is látszik, számos vegyületet teszteltünk a CHO-TRPV1 sejtvonalon és a molekulafejlesztés során elsősorban a kötődés és a élettani aktivitás paramétereire figyeltünk. Ezek alapján történt a vegyületek optimalizálása a további struktúrák szintézise. Mindemellett a különleges viselkedésű vegyületek részletes jellemzése számomra érdekes terület maradt.

Az egyik ilyen meglepő eredményt az IBTU-val kaptam (Tóth et al. 2004), mely kapszaicinnal homológ vegyületként érkezett tesztelésre (58. ábra).



Kapszaicin

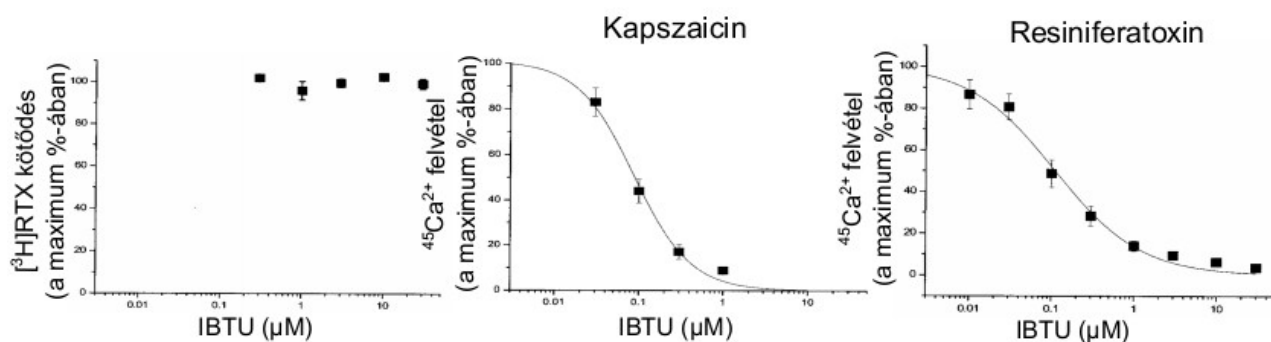


IBTU

58. ábra: Az IBTU szerkezete

(Tóth et al. 2004) alapján.

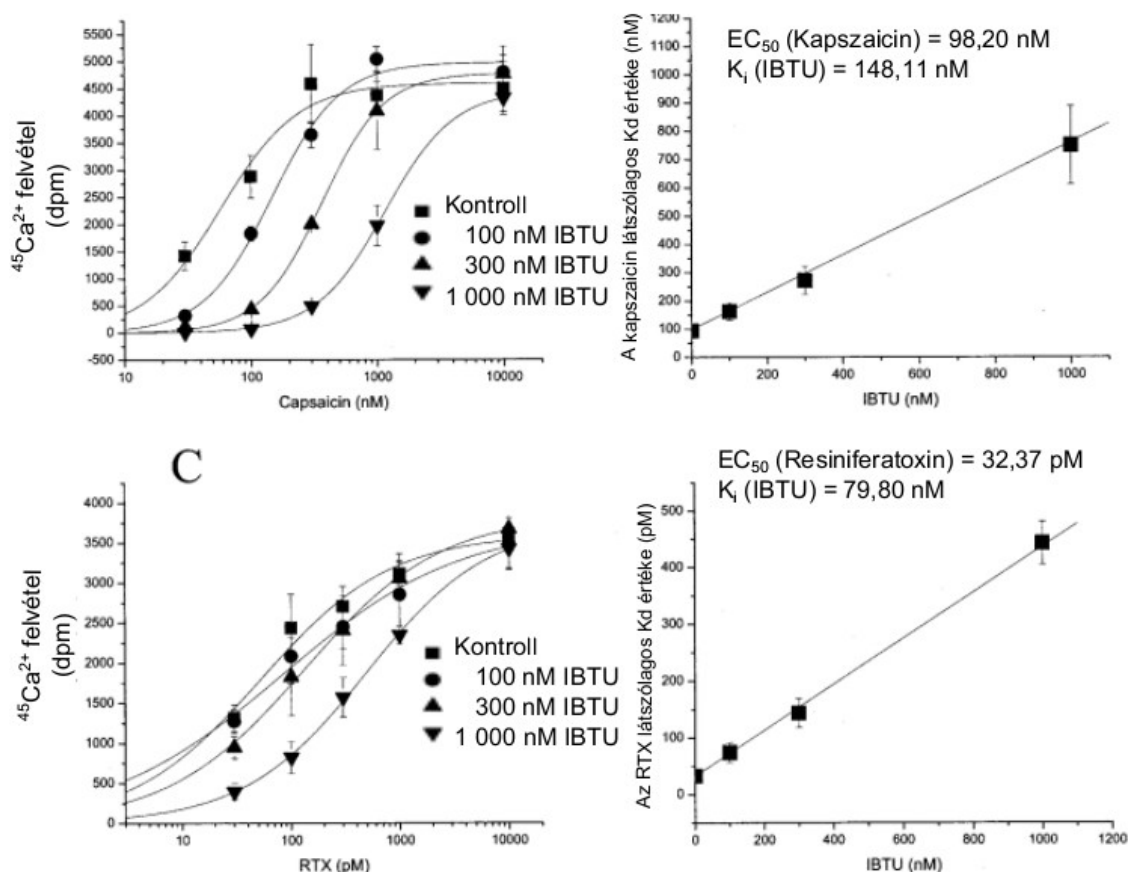
Meglepő tulajdonsága volt, hogy viszonylag nagy hatékonysággal volt képes a kapszaicin kiváltott $^{45}\text{Ca}^{2+}$ beáramlást csökkenteni CHO-TRPV1 sejteken, de nem volt képes a $[^3\text{H}]\text{RTX}$ kötődését gátolni a receptorhoz (59. ábra). Fontos további megfigyelés volt, hogy habár a $[^3\text{H}]\text{RTX}$ 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.



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

Az IBTU hatásait CHO-TRPV1 sejteken vizsgáltuk. A vegyület először nem tűnt perspektívikusnak, 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. Az IBTU különböző koncentrációjú oldatával gátoltuk a resiniferatoxin és a kapszaicin hatásait. A kapott értékekből a látszólagos gátlási állandók felhasználásával becsültük meg az IBTU és a kapszaicin, valamint resiniferatoxin hatékonyságát a ⁴⁵Ca²⁺ beáramlás szabályozásáért felelős receptor populáción (60. ábra).



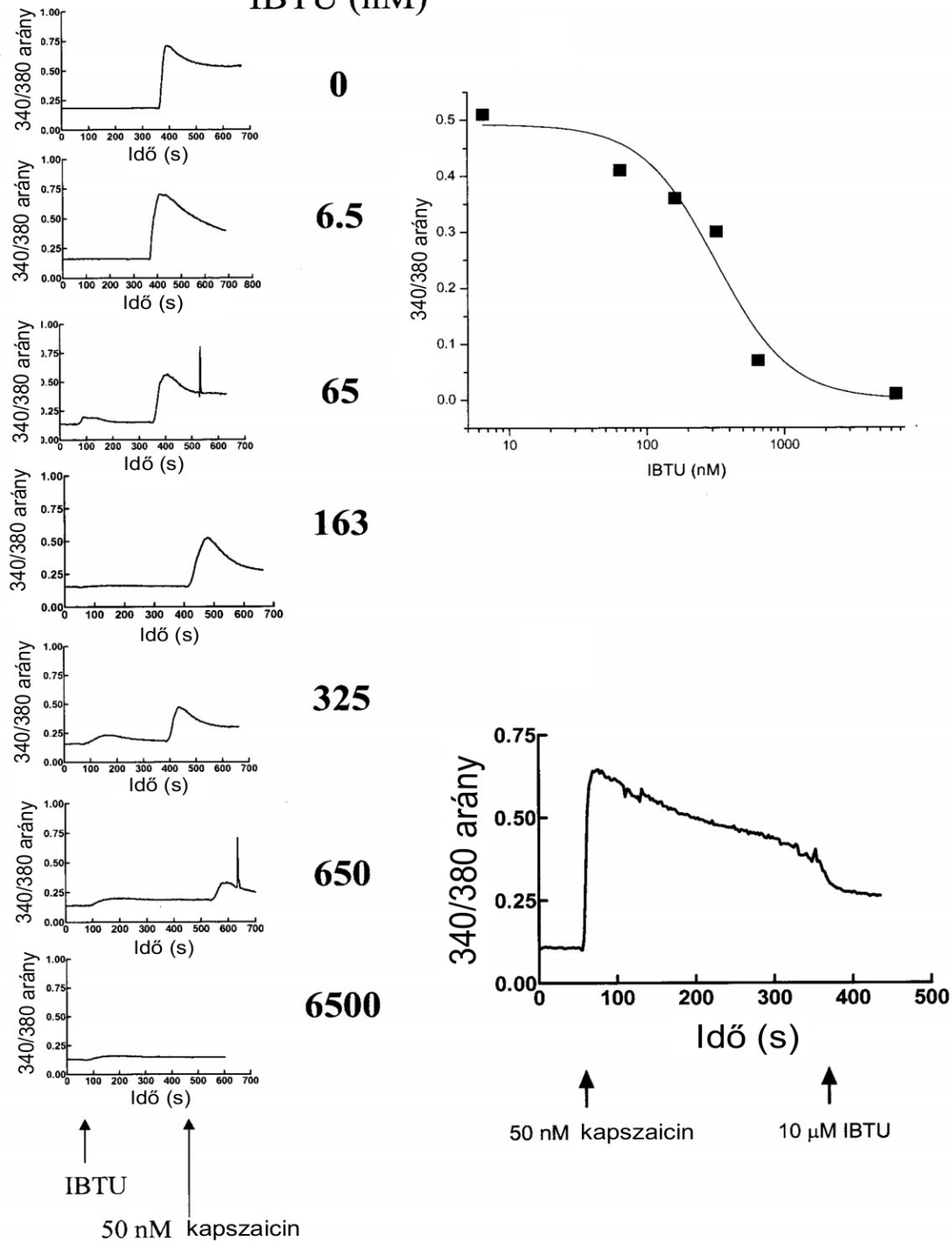
60. ábra: Az IBTU gátló hatása a sejtfelszíni TRPV1-re

Az IBTU $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvételért felelős sejtfelszíni TRPV1-re gyakorolt hatását részletesebb farmakológiai elemzésnek is alávetettük. A kapszaicin (felső grafikonok) és resiniferatoxin (alsó grafikonok) által kiváltott hatásokat különböző koncentrációjú IBTU jelenlétében rögzítettük. A kapott görbék illesztésével (bal oldali grafikonok) meghatároztuk a látszólagos stabilitási állandókat és azokat az IBTU koncentrációjának függvényében ábrázoltuk (jobb oldali grafikonok) (Tóth et al. 2004).

Eredményeink szerint nincs nagy különbség a különböző agonistákra gyakorolt gátló hatásban a sejtfelszíni receptoron. A sejtek válaszainak alaposabb megismerése érdekében intracelluláris Ca^{2+} koncentráció mérést is végeztünk (61. ábra). Eredményeink szerint az IBTU minden sejt kapszaicin válaszát képes volt gátolni, és hatékonysága megegyezett a $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvétellel meghatározott értékkel.

dc_652_12

IBTU (nM)

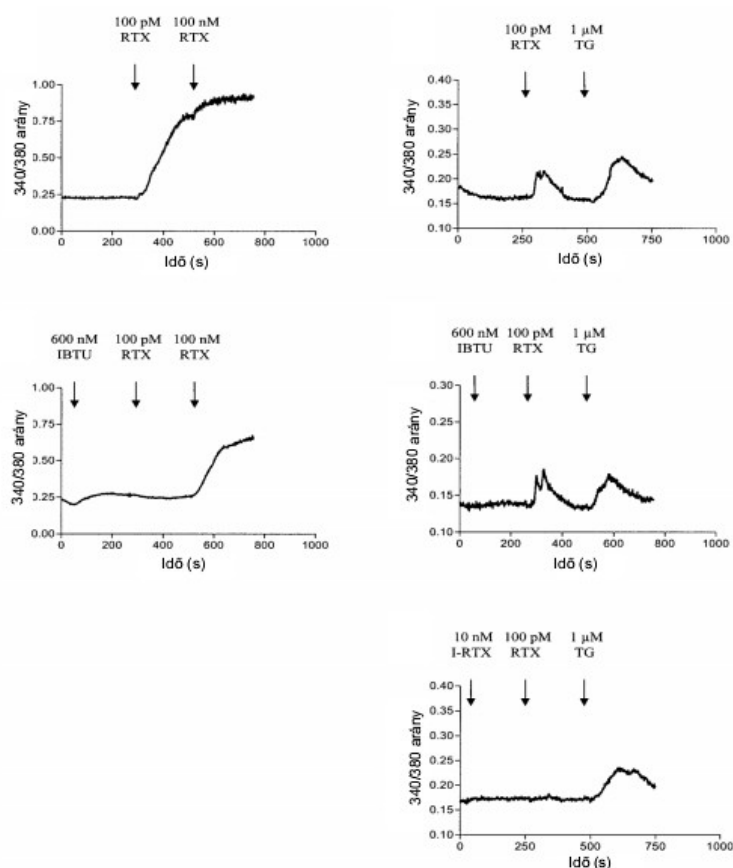


61. ábra: Az IBTU hatása a sejtfelszíni TRPV1-re: kinetika és hatékonyság

Az IBTU hatásait a CHO-TRPV1 sejtek intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változásaira is végeztük. A sejteket minden esetben IBTU-val inkubáltuk elő (5 perc, koncentráció jelölve), majd 50 nM kapszaicinnal kezeltük. A bal oldali grafikonon az egy látótérben lévő sejtek átlagolt intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változásai láthatóak. Az individuális adatok alapján a kapszaicin válasz maximumát ábrázoltuk a jobb oldali felső grafikonon, amit a Hill egyenlettel illesztettünk. Végül, az IBTU-t a kapszaicin által kiváltott válasz kialakulását követően is alkalmaztuk (jobb oldali alsó grafikon) (Tóth et al. 2004).

Végül, az IBTU hatásait a sejten belüli (intracelluláris) TRPV1-re is vizsgáltuk. Ennek során

azt találtuk, hogy habár CHO-TRPV1 sejtekben létezik egy intracelluláris Ca^{2+} raktár, amelyből a thapsigargin és az RTX is képes a Ca^{2+} -ot felszabadítani, az itt elhelyezkedő receptor populációt az IBTU nem tudta gátolni (62. ábra).

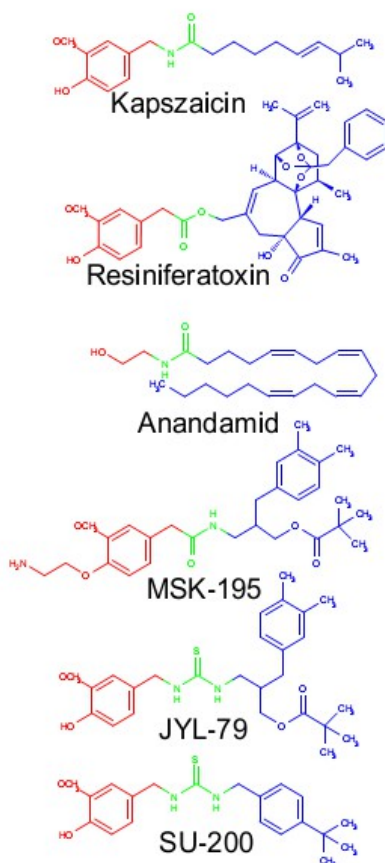


62. ábra: Az IBTU hatása az intracelluláris TRPV1-re

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).

Egy másik tanulmányban azt a kérdést vizsgáltuk részletesen, hogy az individuális vegyületek közötti hatás-kinetikai különbségek milyen molekuláris mechanizmusra vezethetőek

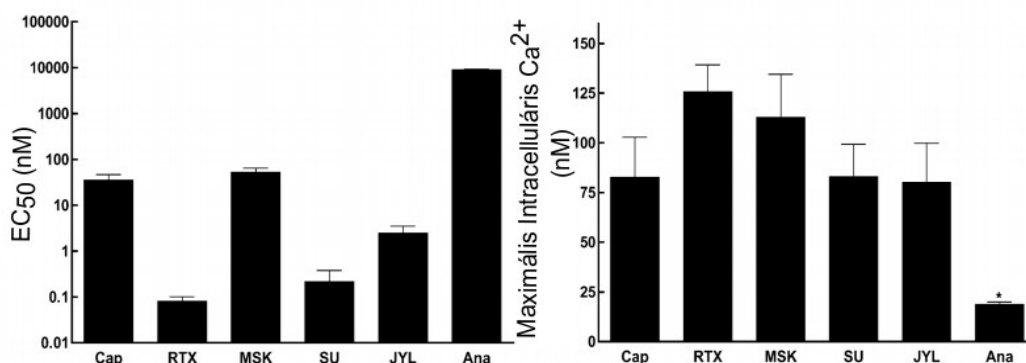
vissza (Tóth et al. 2005). Ehhez az addig azonosított, akkorra publikált szerkezetű vegyületeket használtuk fel (63. ábra).



63. ábra: A kinetikai vizsgálatra használt vegyületek szerkezete

A vegyületek elnevezése a (Tóth et al. 2005) alapján történt.

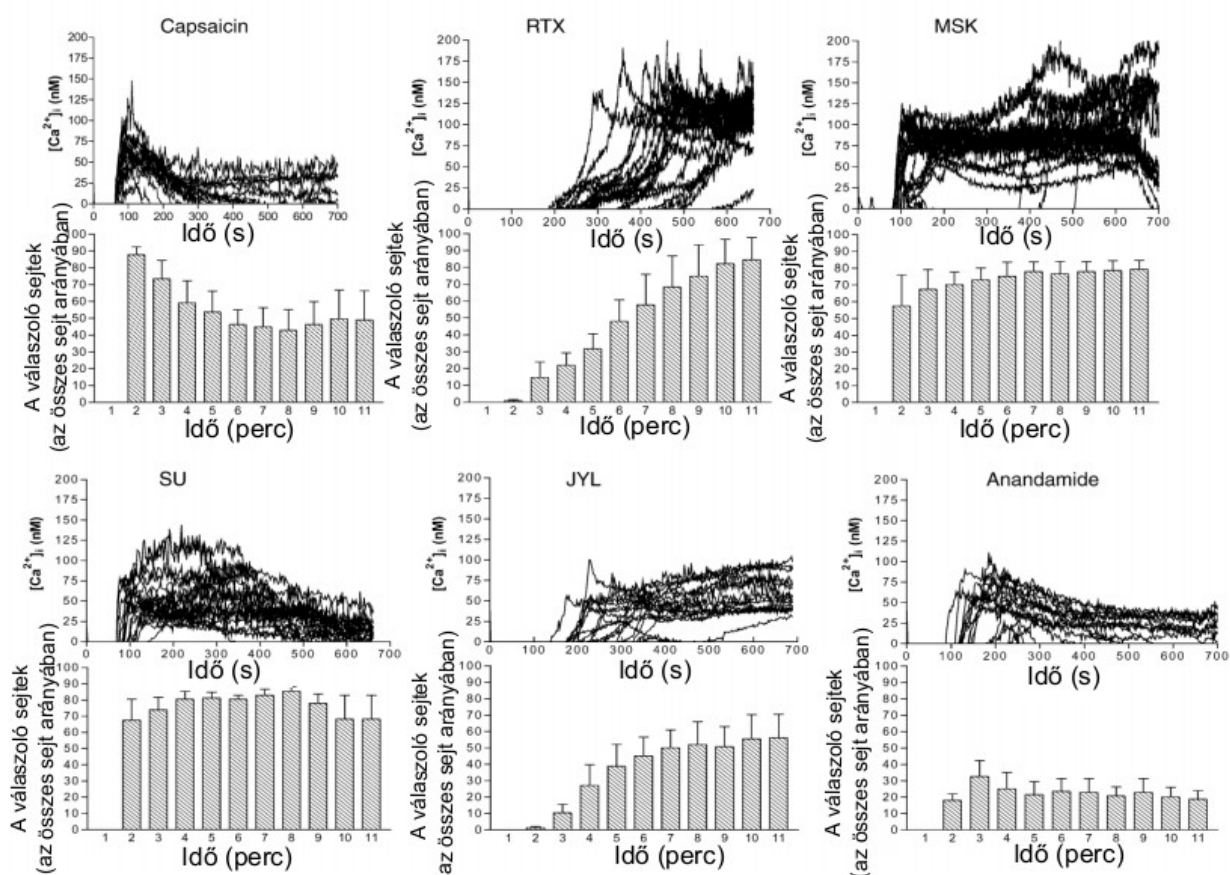
A vegyületek hatékonyságát először a szokványos farmakológiai értékeknek megfelelően jellemeztük: hatásereőség és hatékonyság került meghatározásra (64. ábra). Az adatok alapján nem találtunk nagy eltérést a korábban $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvétellel meghatározott értékekhez képest.



64. ábra: TRPV1 agonisták farmakológiai hatásossága

A grafikonokon a vegyületek intracelluláris Ca²⁺ koncentrációt emelő hatásának főbb farmakológiai adatait tüntettük fel. Bal oldalon a hatékonyság, míg jobb oldalon a maximális intracelluláris Ca²⁺ koncentráció emelkedés látható (Tóth et al. 2005).

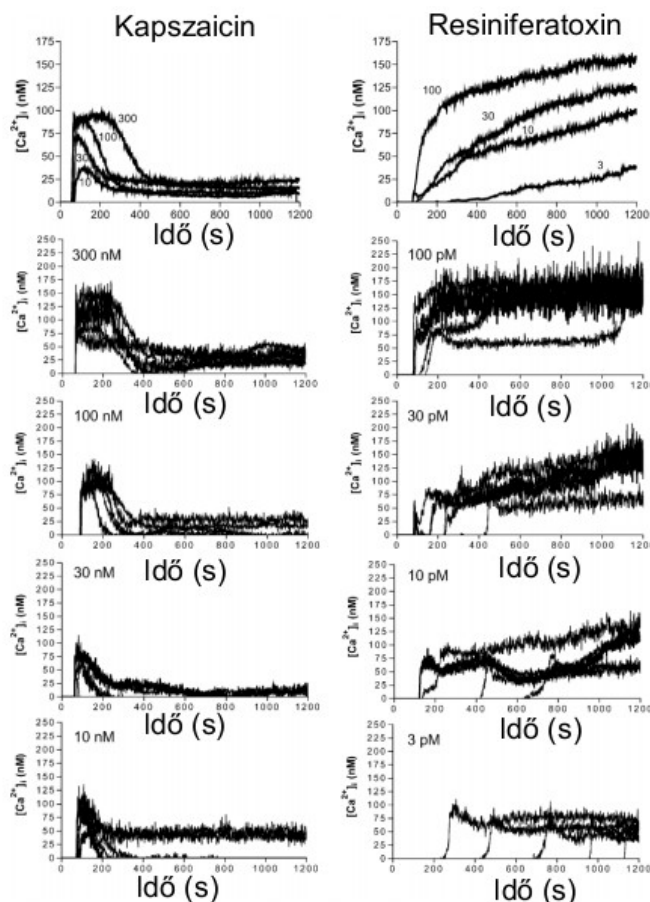
Az individuális sejtek válaszkészségét vizsgálva ugyanakkor feltűnt, hogy a sejtek válasza a kezelések során eltérő volt (65. ábra). Alapvetően kétféle mintázatot figyeltünk meg, melyek a kapszaicinre és a resiniferatoxinra voltak jellemzőek. A kapszaicin esetében a sejtek uniform módon, a kapszaicin hozzáadását követően hamar válaszoltak, majd egy viszonylag rövid idő múlva a kapszaicin jelenlétében deszenzibilizálódtak, tehát a sejtek intracelluláris Ca²⁺ 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 Ca²⁺ 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 (65. ábra).



65. 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).

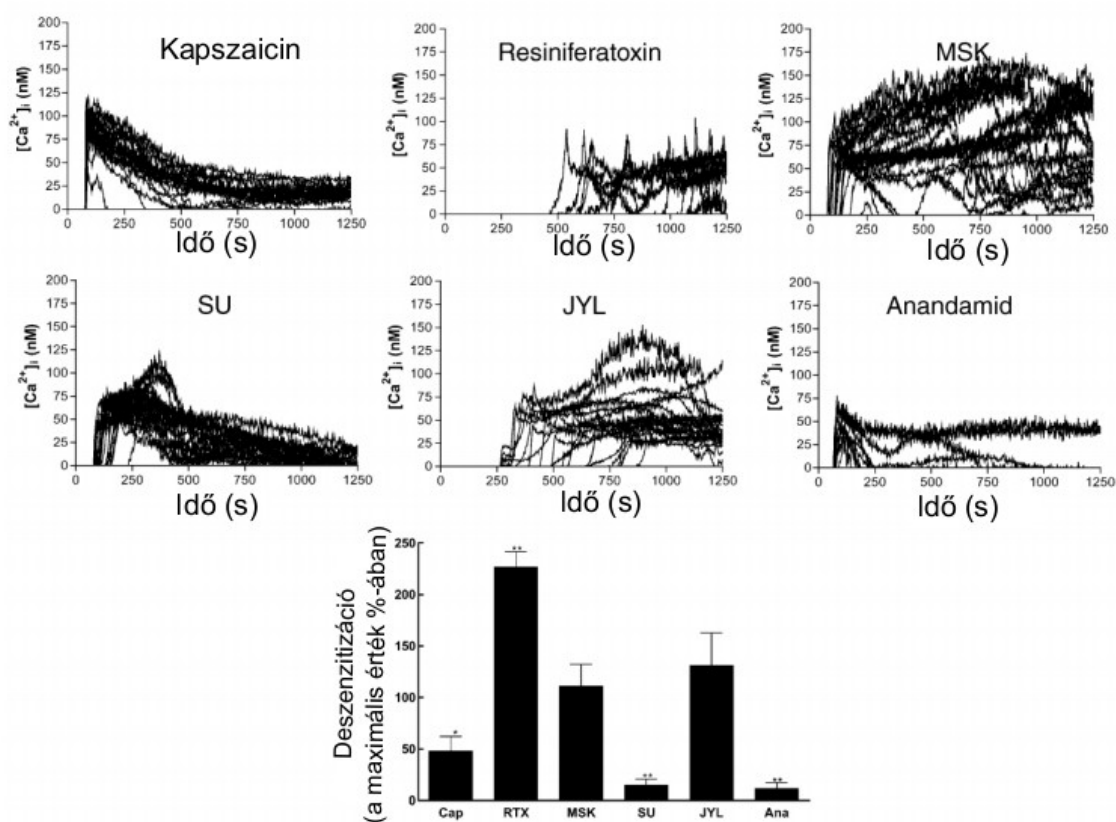
A kinetikai jelenségek pontosabb leírására a kapszaicin és a resiniferatoxin esetében véletlenszerűen választottunk ki sejteket a látótérből. Ezen kiválasztott sejtek esetében jól látható a kapszaicin és a resiniferatoxin által kiváltott intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedések időbeli lefutása közötti különbség (66. ábra).



66. ábra: A kapszaicin és a resiniferatoxin hatása CHO-TRPV1 sejtek intracelluláris Ca^{2+} koncentrációjára

Az egy látótérben látható összes CHO-TRPV1 sejtek közül az első 5 sejtet választottunk ki és az ábrán az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változásokat tüntettük fel. A bal oldali grafikonok a kapszaicin grafikonokon jelölt koncentrációinak alkalmazása mellett, míg a jobb oldali grafikonok a resiniferatoxin jelenlétében készültek (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 (67. ábra). 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.



67. ábra: Az akut deszenzibilizáció mértéke CHO-TRPV1 sejteken

Az egy látótérben látható összes CHO-TRPV1 sejt esetében rögzített intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változásokat tüntettük fel az ábrán (x-y diagramok). Az oszlopdiagramokon azt tüntettük fel, hogy az első 10 perc során rögzített maximális intracelluláris Ca^{2+} koncentráció hány százaléka volt a 21. percben rögzített érték (Tóth et al. 2005).

A TRPV1 válaszkésztségének szabályozása foszforiláció által viszonylag jól leírt folyamat. Mindemellett arról, hogy a receptor foszforiláltsági állapotának milyen összefüggése lehet az alkalmazott vegyületekkel kevés adat állt rendelkezésre. Ezen modalitást is vizsgáltuk, mind agonista (68. ábra), mind antagonistá vegyületek segítségével (69. ábra). 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).

Agonista	Kontroll EC ₅₀ nM	+Ciklosporin-A EC ₅₀ nM	Arány
Kapszaicin	94.8±8.4	45.3±4.8 [*]	2.1
Resiniferatoxin	1.49±0.26	1.31±0.19 ^{**}	1.1
Evodiamin	838±41	441±6.0 ^{***}	1.9
DA-5018	381±48	48.6±5.8 [*]	7.8
Olvanil	193±31	84±18 ^{***}	2.3
CHK-679	54.8±9.0	10.7±1.5 [*]	5.1
PSY-179	5.49±0.27	2.63±0.13 ^{***}	2.1
PPAHV	157±11	110.9±3.3 ^{***}	1.4

* p<0,01; ** p<0,05; *** p<0,001

68. ábra: TRPV1 agonisták hatékonyságának függése a receptor foszforilációjától
(Pearce et al. 2008) alapján.

Az antagonisták 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.

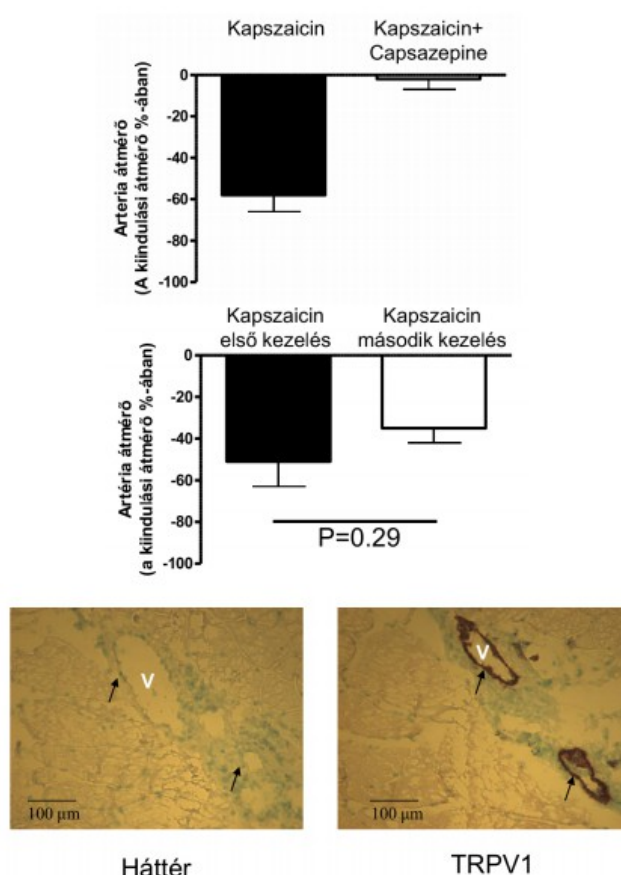
Antagonista	Kontroll EC ₅₀ nM	+Ciklosporin-A EC ₅₀ nM	Arány
BCTC	0.35±0.07	0.53±0.12 [*]	0.66 (1.5)
HCR-331	4.62±0.7	7.14±0.7 [*]	0.65 (1.5)
YHS-369	17.6±3.5	29.6±4.0 [*]	0.6 (1.7)
AMG-9810	33.0±0.6	50.2±4.5 ^{**}	0.66 (1.5)
HCR-211	97.8±9.0	137.2±4.8 ^{**}	0.7 (1.4)
SB-366791	516±60	1305±57 ^{***}	0.4 (2.5)
Capsazepine	574±30	964±61 ^{****}	0.6 (1.7)

* p<0,01; ** p<0,05; *** p<0,001

69. ábra: TRPV1 antagonisták hatékonyságának függése a receptor foszforilációjától
(Pearce et al. 2008) alapján.

3.5. A vaszkuláris TRPV1

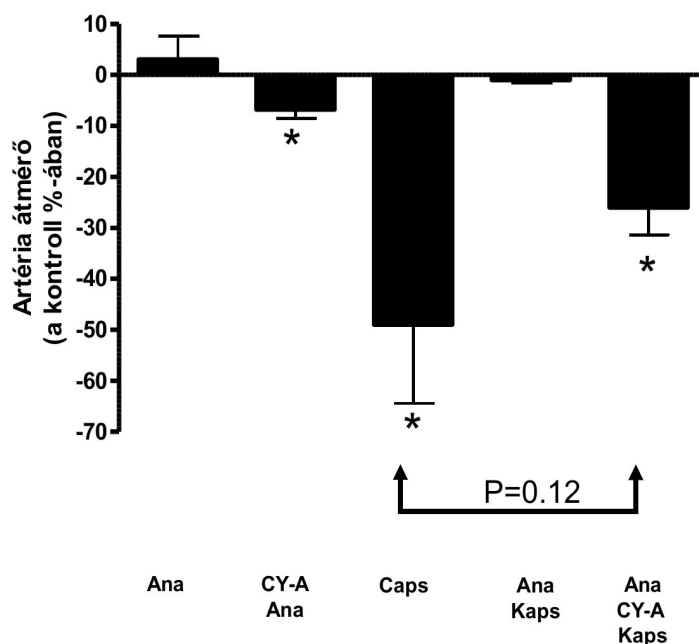
Magyarországra hazatérve a molekuláris farmakológia eszközeit és lehetőségét sajnos elvesztettem. A TRPV1 területén figyelmem az élettani hatásokra és azon belül a vaszkuláris hatásokra irányult. Először azt vizsgáltuk, hogy a TRPV1 stimuláció milyen hatással van vázizomerekre (70. ábra). 1 µM kapszaicin 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 (70. ábra). A receptor elhelyezkedését vizsgálva azt a patkány vázizom artéria simaizom rétegében találtuk immunhisztokémiával.



70. ábra: Funkcionális TRPV1 expresszió patkány vázizomerekben

A kísérletekben a kapszaicin hatásait vizsgáltuk patkányok vázizomából izolált artériákon. A kapszaicin ($1 \mu\text{M}$) 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).

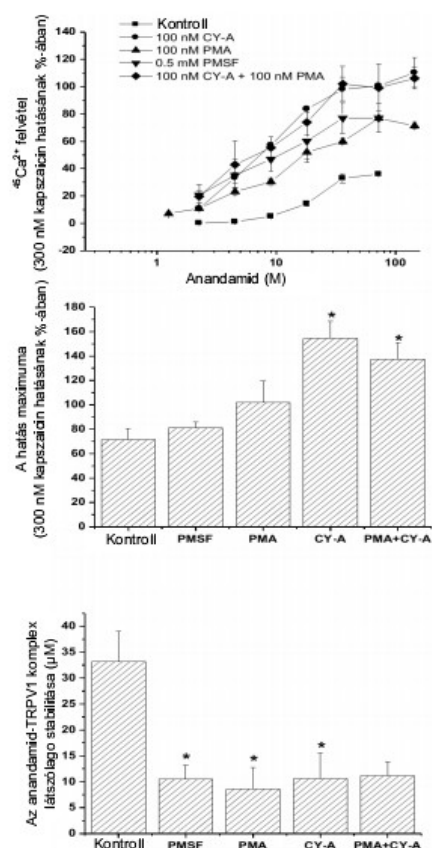
Ezt követően megkíséreltük a vaszkuláris TRPV1 aktivációjának lehetséges módjait feltérképezni. A TRPV1 endogén ligandnak gondolt anandamid esetében nem kaptunk vaszkuláris hatást ebben a rendszerben, azonban a receptor érzékenyítését (ciklosporin-A) követően az anandamid is konstriktót váltott ki (71. ábra). 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 foszfatáz gátló ciklosporin-A alkalmazásával (71. ábra).



71. ábra: Anandamid hatása a vaszkuláris TRPV1-re

Az TRPV1 endogén ligandjának tartott anandamidnak kismértékű dilatatív hatása volt a vázizomerekre, ami ciklosporin-A-val történő előkezelés hatására (kalcineurin gátlás mellett) kismértékű vazokonstrikcióba fordult. Az anandamid előkezelés csökkentette a kapszaicin vázizomér-összehúzó hatását, míg az anandamiddal és ciklosporin-A-val kezelt erek kapszaicin válasza többé-kevésbé megtartottnak bizonyult (Lizanecz et al. 2006).

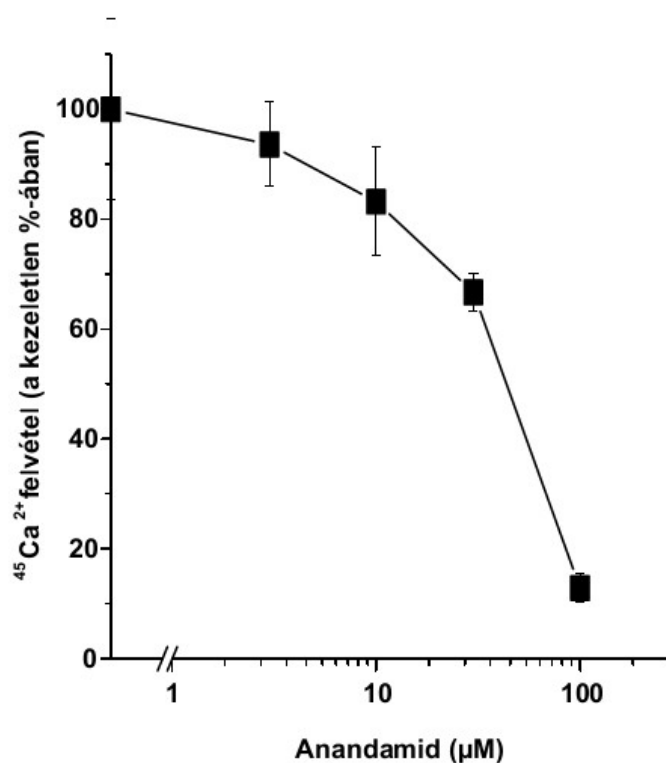
Az anandamid válaszok foszforilációval történő szabályozását részleteiben vizsgáltuk CHO-TRPV1 sejtek felhasználásával. A sejtek PKC aktivátor PMA és kalcineurin (protein foszfatáz 2B) gátló ciklosporin-A különböző kombinációival voltak kezelve, és az anandamid válaszaikat mértük (72. ábra). Eredményeink szerint az anandamid hatásere 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 (72. ábra).



72. ábra: Anandamid válaszkészség szabályozása CHO-TRPV1 sejtekben

Mint azt korábbi kísérleteink kapcsán is bemutattam, a TRPV1 ligandok hatékonyságát nagymértékben befolyásolhatja a receptor környezete. Ezt a jelenséget az anandamid esetében is vizsgáltuk. Az anandamid lebomlását katalizáló szabad szírsavamid hidrolázt fenilmetánszulfonil fluoriddal (PMSF) gátoltuk. A foszforilációs hatásokat a protein kináz C aktivátor forbol-12-mirisztil-13-acetát (PMA) és a kalcineurin gátló ciklosporin-A felhasználásával biztosítottuk. Ezen anyagokkal CHO-TRPV1 sejteket inkubáltunk 15 percig, majd az anandamid által kiváltott $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvételt határoztuk meg 5 perc alatt. Az adatokat a 300 nM kapszaicin által kiváltott maximális hatásokra (felső két grafikon), illetve a kapott görbék illesztésével (alsó grafikon) határoztuk meg. Valamennyi kezelés hatására mintegy háromszorosára nőtt az anandamid-TRPV1 komplex látszólagos stabilitása (alsó grafikon), és a hatékonyságban is megmutatkozott jelentős növekedés (középső grafikon) (Lizanecz et al. 2006).

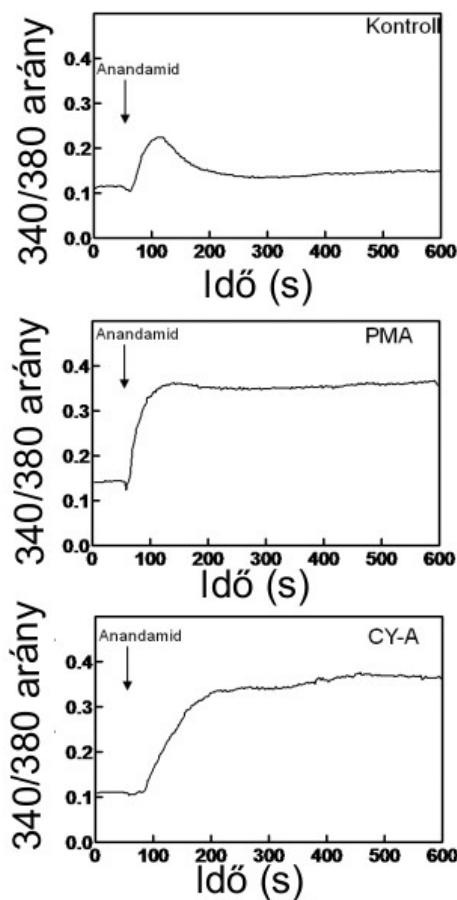
A vaszkuláris kísérletek azt sugallták, hogy az anandamid a TRPV1 deszenzibilizációjával képes lehet a TRPV1 további agonista stimulusokra adott válaszainak gátlására. Ezért olyan kísérletet terveztünk, amelyben CHO-TRPV1 sejteket anandamiddal kezeltünk, majd mértük a kapszaicin válaszaikat (73. ábra). Eredményeink szerint az anandamid valóban képes volt gátolni a TRPV1 közvetített válaszokat.



73. ábra: Anandamid mediált TRPV1 gátlás CHO sejteken

Ellenőriztük, hogy az anandamid a NADA-hoz hasonlóan képes-e gátolni a CHO sejtekben expresszáldó TRPV1-et, ha annak aktivitását az anandamidnál nagyobb hatáserősségű kapszaicinnal aktiváljuk. A kísérletekben a CHO-TRPV1 sejteket 15 percig inkubáltuk az x-tengelyen feltüntetett anandamid koncentrációk mellett, majd a ⁴⁵Ca²⁺ felvételt 50 nM kapszaicinnal aktiváltuk. Az adatokat az anandamid nélküli kontroll százalékában fejeztük ki (Lizanecz et al. 2006).

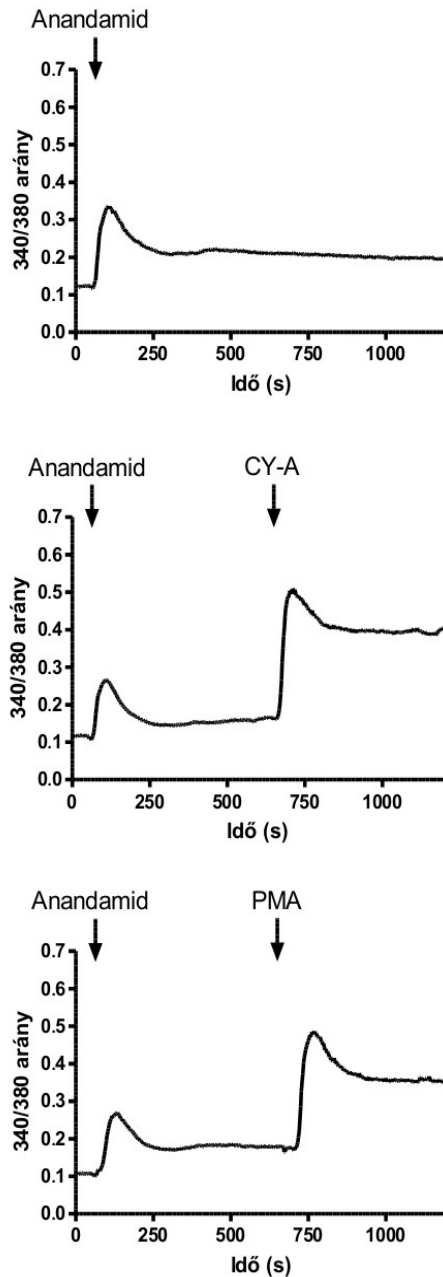
Ezt követően vizsgáltuk az anandamid foszforilációt elősegítő kezelések során jelentkező látszólagosan nagyobb válaszkészségének okát az egyedi CHO-TRPV1 sejtek esetében intracelluláris Ca²⁺ koncentráció mérések alapján (74. ábra). Az eredmények szerint az anandamid gyorsan deszenzibilizálódó részleges 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 (74. ábra).



74. ábra: Foszforiláció hatása az anandamid TRPV1-re gyakorolt hatásaira

A foszforilációs hatások korábban $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvétellel kimutatott moduláló szerepét az anandamid válaszokra CHO-TRPV1 sejteken az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció mérésével is ellenőriztük. Az anandamid önmagában egy gyorsan deszenzibilizálódó tranziens intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedést váltott ki ezekben a sejtekben (felső grafikon). Ezen intracelluláris Ca^{2+} jel maximuma jelentősen nőtt a PMA (középső grafikon, 100 nM, 5 perc előinkubáció) és a ciklosporin-A (CY-A, 100 nM, 5 perc előinkubáció) jelenlétében, és a deszenzibilizáció is jelentősen csökkent (Lizanecz et al. 2006).

Az anandamid sok más ingerületátvivő anyaggal szemben nem tárolódik a sejteken belül, hogy megfelelő hatásokra onnan nagy koncentrációban felszabaduljon, hanem szintézisét követően azonnal képes a sejtmembránokon átdiffundálva a testnedvekbe, vagy a környező sejtekbe jutni. Ennek megfelelően szintje többé-kevésbé állandó. 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 (75. ábra). Az adatok szerint az anandamid által kiváltott viszonylag kismértékű stimuláció (részleges agonizmus) a foszforiláció fokozására jelentősen növekedett.

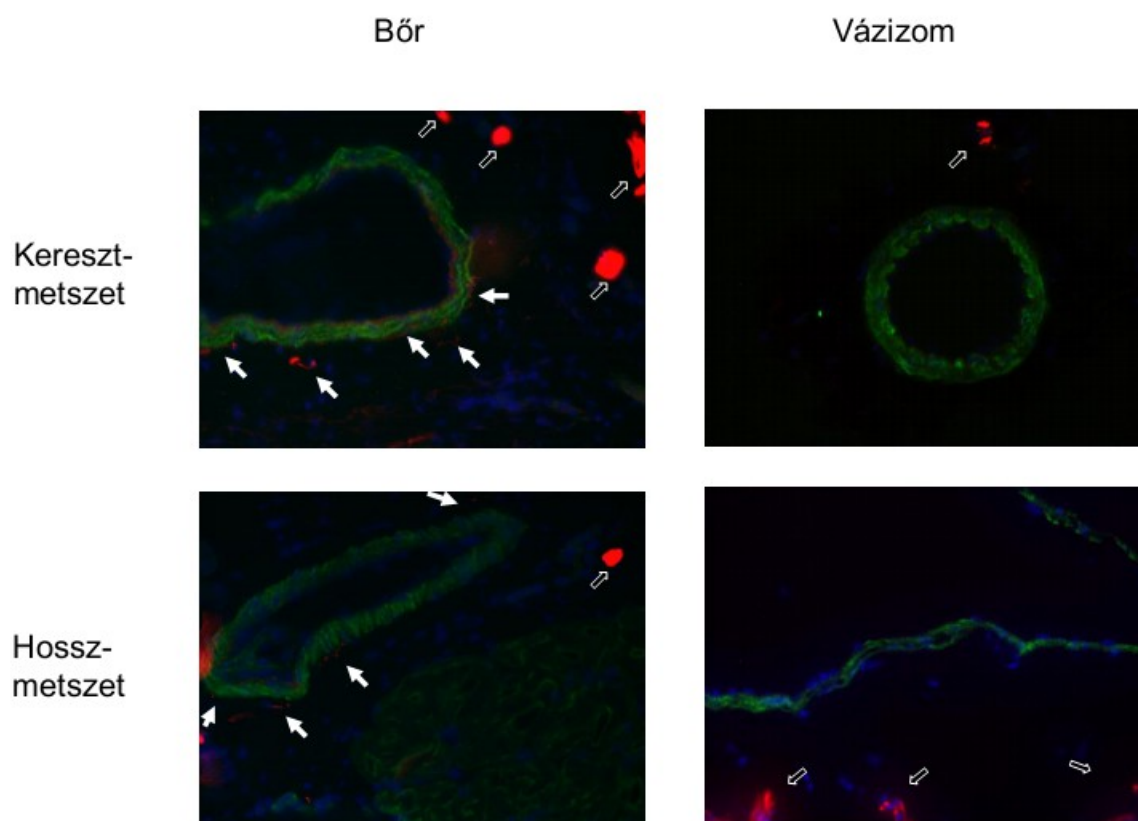


75. ábra: Foszforiláció hatása alacsony dózisu anandamiddal történő kezelés során

Az anandamid erős deszenzibilizáló hatással rendelkezett (74. ábra, 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).

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, 76. ábra). Eredményeink szerint a bőrben számos idegsejt nyúlványa helyezkedik el az erek környékén, ezzel szemben a vázizomban az artériák környezetében nincsenek jelentős számban idegvégződések (76. ábra).



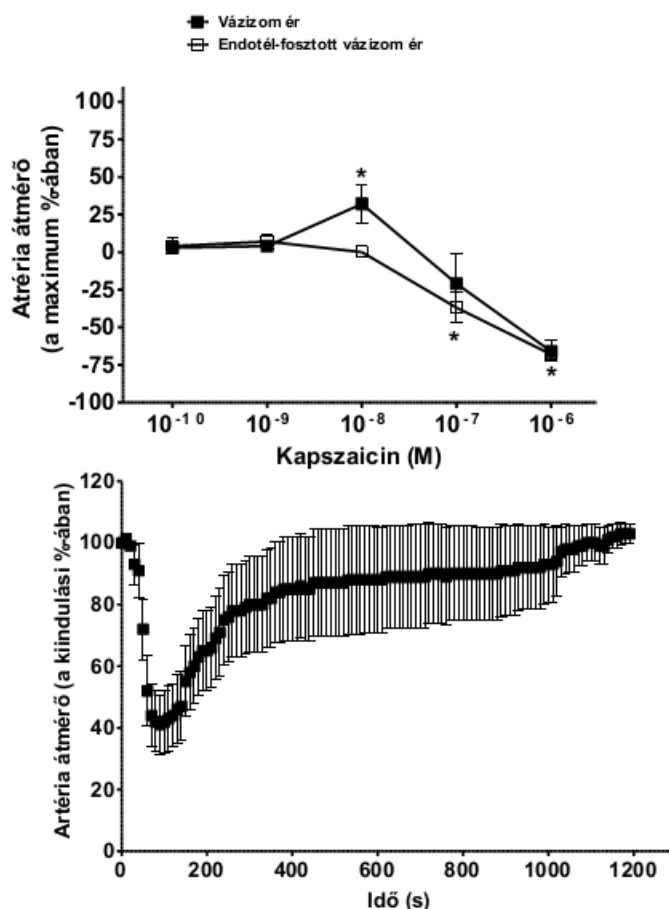
76. ábra: Neurofilament expresszió a bőrben és a vázizomban

A perivaszkuláris idegsejt terminálisokat neurofilament festéssel mutattuk ki (piros szín). Az erek kimutatására simaizom aktin festést (zöld) alkalmaztunk. A bőr esetében számos nagyobb idegrostot (nem kitöltött nyilak) azonosítottunk a számos perivaszkuláris nyúlvánnyal együtt (kitöltött nyilak). A vázizom esetében a perivaszkuláris nyúlványok hiányoztak (Kark et al. 2008).

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 expresszálandó TRPV1 hatásai nagyobb jelentőségűek

dc_652_12

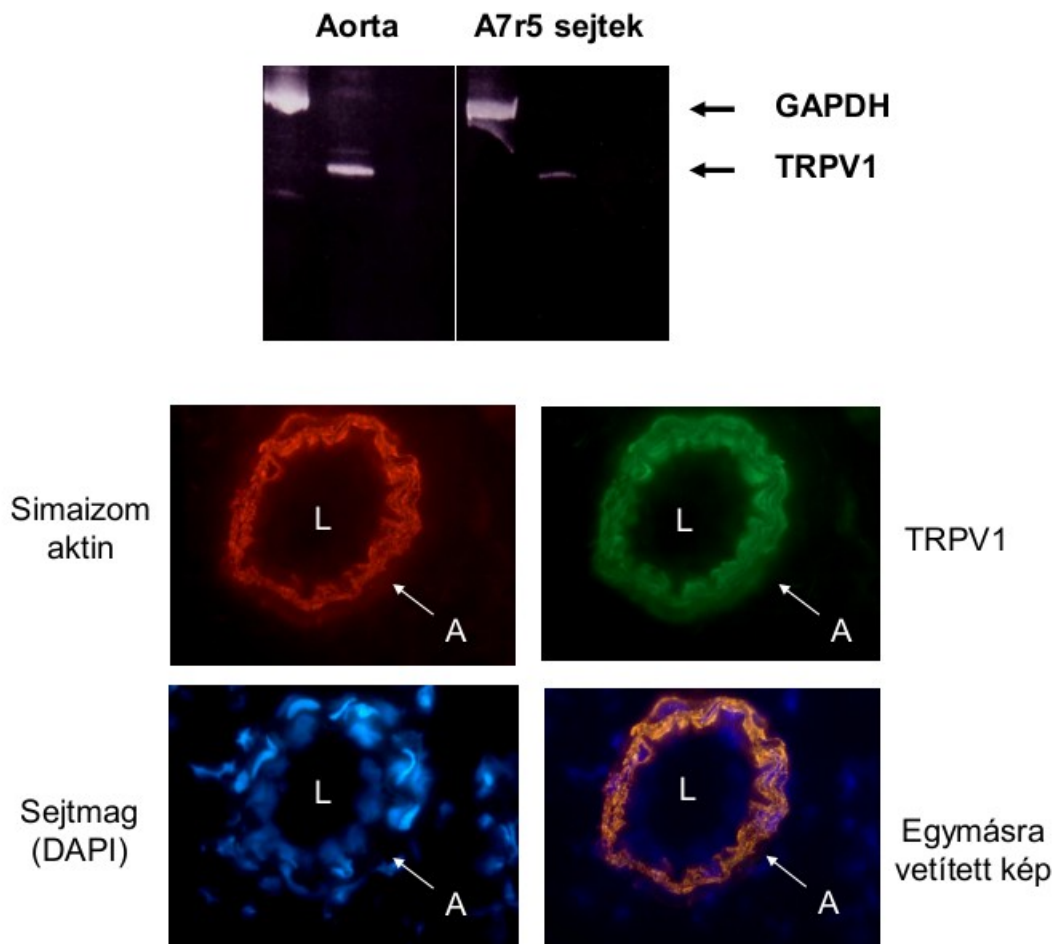
lehetnek, és aktivációjának következménye konstriktó lesz. Ezen konstriktó pontos mechanizmusának feltárása érdekében további kísérleteket folytattunk. Ennek során először a TRPV1 funkcionális tulajdonságait vizsgáltuk ebben a rendszerben. A kapott adatok szerint a kapszaicin 1 μM -os koncentrációban már teljes mértékű artéria konstriktót váltott ki, ami arra utalt, hogy a jelenség csakugyan specifikus lehet a TRPV1-re (77. ábra). 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.



77. ábra: Kapszaicin által kiváltott arteriális vazokonstriktió koncentráció-függése és kinetikája

A kapszaicin érhataásait részletesen karakterizáltuk. Ennek első lépéseként vizsgáltuk a kapszaicin koncentráció-hatását. Alacsony koncentrációk mellett ebben a rendszerben kismértékű dilatációt találtunk, amely endotél hiányában nem volt látható. Ugyanakkor az endotél fosztás nem befolyásolta a konstriktiót. Ezt követően az erek kapszaicin válaszána kinetikáját vizsgáltuk. Az érátmérőt 1 μ M kapszaicin hozzáadása során 10 másodpercenként rögzítettük. Az alsó grafikonon 5 ér átlagolt választ mutatjuk be (Kark et al. 2008).

Végül, megkíséreltük a vazokonstriktióért felelő TRPV1-et expresszáló sejttípus azonosítását is. A funkcionális kísérletekben felhasznált vázizom artériát tartalmazó szövetben immunhisztokémiai módszerrel tettük láthatóvá a TRPV1-et a simaizom aktinnal együtt festve (78. ábra). A TRPV1 és a simaizom specifikus festődés egybeesése a receptor simaizomsejtekben történő expressziójára utalt. A TRPV1 mRNS-ének jelenlétét sikerült kimutatnunk egy immortalizált simaizom sejtvonalon is (A7r5 sejtek), amely tény ismét arra utalt, hogy a TRPV1-et expresszáló sejtvonal arteriális simaizom lehet.

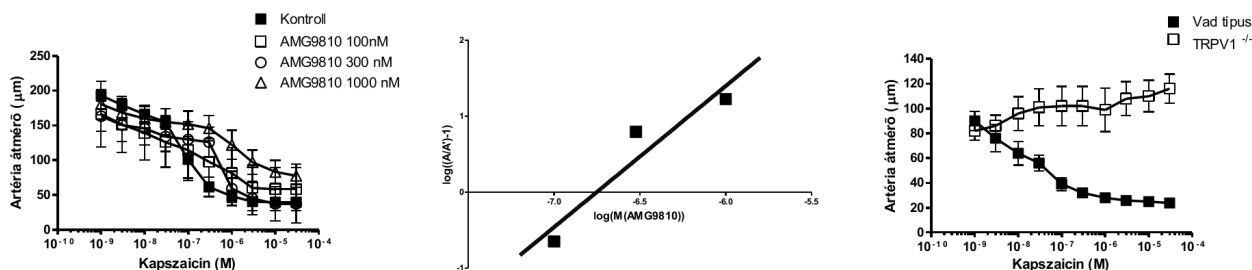


78. ábra: TRPV1 expresszió vázizomerek simaizomsejtjeiben

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).

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 specifikitását vizsgáltuk. A kísérletekben farmakológiai és genetikai úton gátoltuk a TRPV1 funkciót, és megfigyeltük a kapszaicin válaszkészség változását. A farmakológiai gátlás során az AMG-9810 antagonistá növekvő dózisa mellett határoztuk meg a vazokonstrikció kapszaicin dózis függését (79. ábra). Az eredmények

szerint a kapszaicin az AMG9810-zel kompetitív módon okozott vazokonstriktiót, továbbá a vazokonstriktió TRPV1 génhiányos egérben nem volt megfigyelhető.

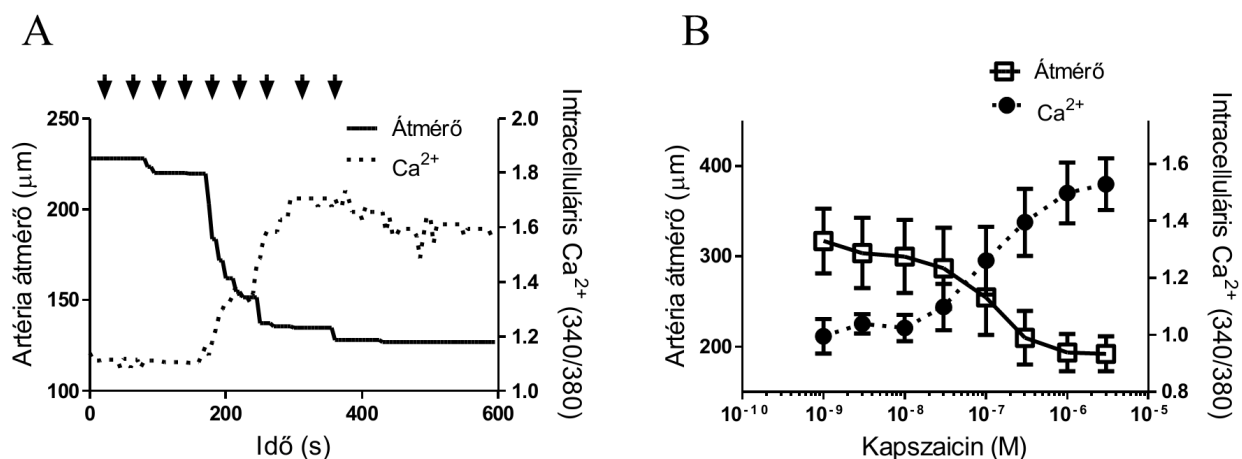


79. ábra: A kapszaicin kiváltott vazokonstriktió TRPV1 specifikitása

A vazokonstriktív TRPV1 struktúra-aktivitás viszonyainak feltárását a cikk bírálata során felmerült kérdésnek megfelelően annak igazolásával kezdtük, hogy a tesztelt vegyületek hatásait a TRPV1-en fejtik ki. Ennek érdekében a kapszaicin kiváltott vazokonstriktióban a TRPV1 specifikitást farmakológiai, genetikai és élettani modellekben is igazoltuk. A farmakológiai módszerben kimutattuk, hogy az AMG9810 kompetitíven, a TRPV1-en talált hatékonyságával összhangban gátolta a kapszaicin kiváltotta vazokonstriktiót. A bal oldali grafikonon a különböző kompetáló AMG9810 koncentrációk mellett felvett kapszaicin koncentráció-hatások láthatóak. A farmakológiai értékelést mutatja a középső grafikon. Végül a kapszaicin hatásait TRPV1 génhiányos egérben is vizsgáltuk. TRPV1^{+/+} egerekben a kapszaicin hatására a patkányban látott konstrikciót tapasztaltuk, ami teljesen hiányzott a TRPV1^{-/-} egérben (Czikora et al. 2012).

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

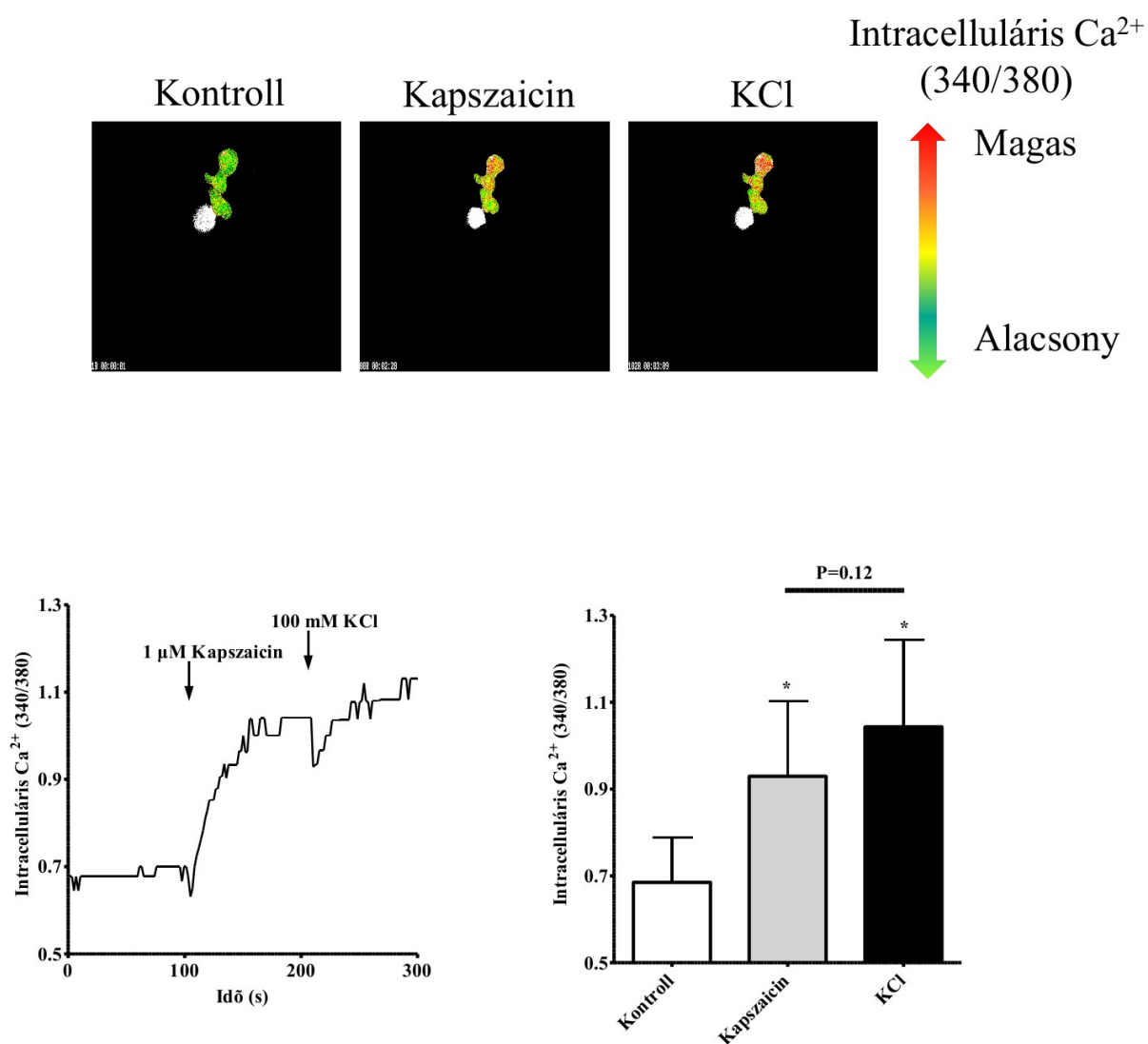
Ehhez a vázizom artériák esetében párhuzamosan mértük az átmérőváltozást és a simaizom rétegben az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációváltozásokat (80. ábra). Az eredmények szerint a vazokonstriktió egybeesik az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció megemelkedésével.



80. ábra: A TRPV1 aktiváció intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedésén keresztül fejti 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 keresztül 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).

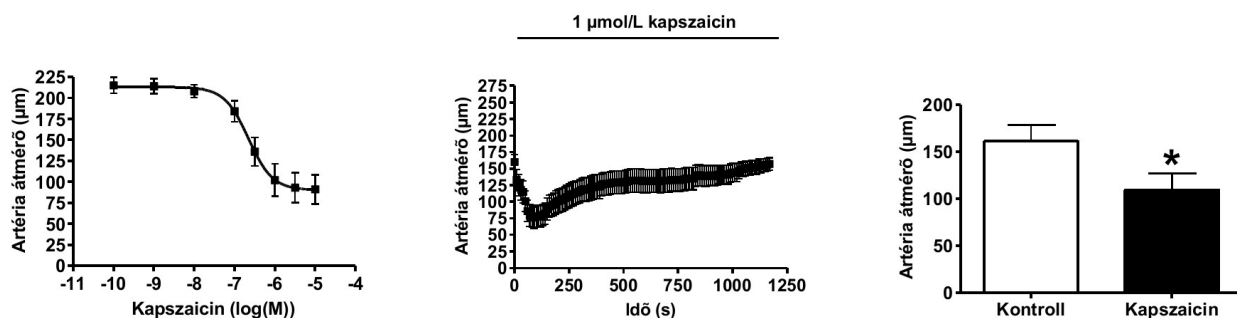
Annak igazolására, hogy az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedése a simaizomban expresszáldó receptor aktiválásának közvetlen következménye, simaizomsejteket izoláltunk és kapszaicinnal kezeltünk (81. ábra). A kezelés hatására a simaizomsejtek egy jelentős részénél intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedést kaptunk, ami összemérhető volt a KCl által kiváltható (maximális) növekedéssel.



81. ábra: Funkcionális TRPV1 expresszió izolált arteriális simaizomsejtekben

Ebben a kísérletsorozatban a vaszkuláris simaizomban expresszáldó TRPV1 létét élettani megközelítéssel igazoltuk. A kísérletben simaizom sejteket izoláltunk kutya koronária erekből. Ezt követően az izolált simaizomsejteket kapszaicinnal kezeltük és az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változásokat rögzítettük. A felső ábrán egy látótér látható, amelyben három egymáshoz közeli simaizomsejt közül kettő válaszol kapszaicin stimulusra (pirosabb szín, magasabb intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt jelöl). A bal alsó kép egy individuális sejt adatait mutatja. A kapszaicinre mérhető intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növekedéssel válaszoló sejtek esetében vizsgáltuk, hogy a változás mértéke hogyan vethető össze a magas extracelluláris K^{+} által kiváltott hatással (Czikora et al. 2012).

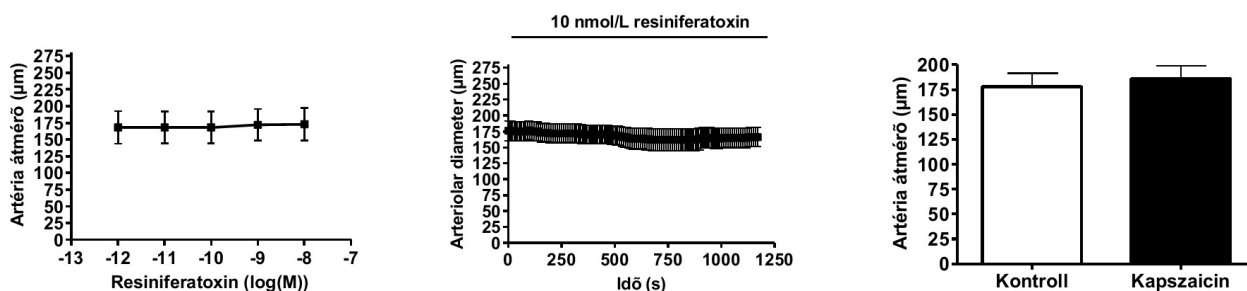
A TRPV1 vaszkuláris simaizomban történő expressziójának igazolását követően a simaizomban lokalizálódó TRPV1 farmakológiai tulajdonságait is meghatároztuk. Ennek keretében a korábban a TRPV1 sejtes válaszok kinetikájának vizsgálatára alkalmazott agonistákkal (63. ábra) történő kezelés hatásait vizsgáltuk. Először a kapszaicin hatásait reprodukáltuk (82. ábra).



82. ábra: Kapszaicin hatásai a simaizombban 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 (83. ábra). A resiniferatoxin esetében nem kaptunk semmilyen kézzelfogható érválaszt, azonban a kezeléseket követően a TRPV1 nem volt kapszaicinnal ingerelhető, teljes deszenzibilizáció volt megfigyelhető.

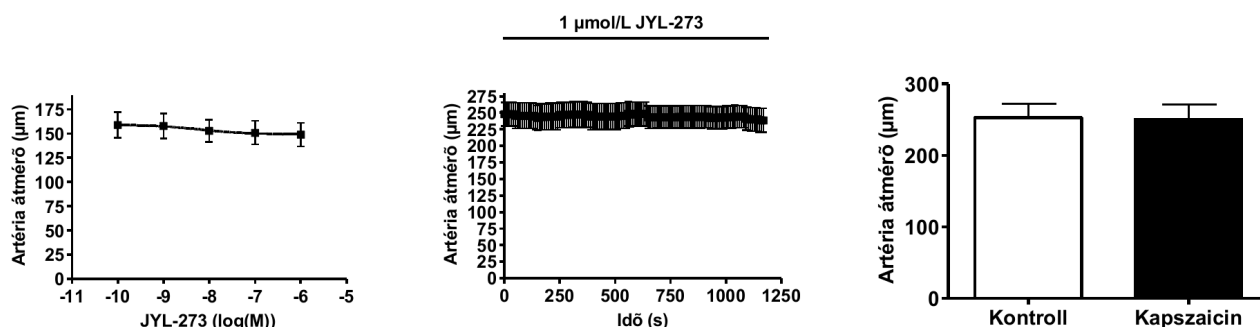


83. ábra: Resiniferatoxin hatásai a simaizombban lokalizálódó TRPV1-re

A resiniferatoxin patkány vázizomból izolált arteriolában endogénen expresszáldó TRPV1-re gyakorolt hatásait vizsgáltuk. A bal oldali grafikon a resiniferatoxin dózis-hatását láthatjuk az erek átmérőváltozására. A középső grafikon a maximális dózisú (10 nM) resiniferatoxin 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 JYL-279 jelű vegyület esetében a resiniferatoxinhoz hasonló hatásokat kaptunk: az artéria átmérőben okozott látható változások nélkül teljes mértékben deszenzibilizálta az ereket

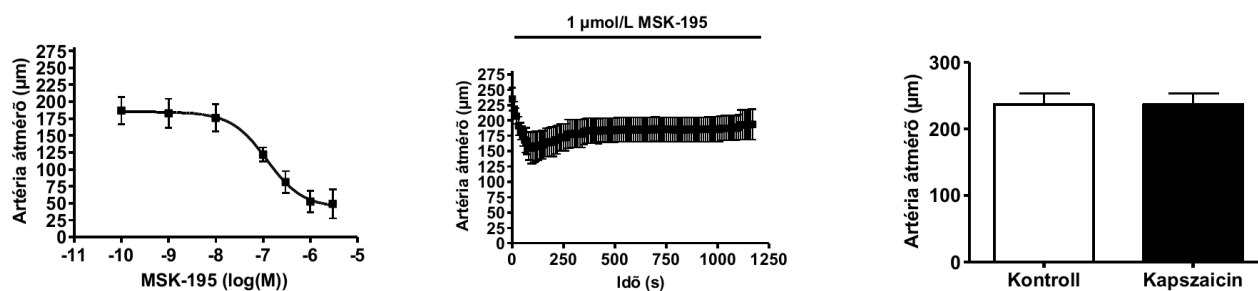
kapszaicinre (84. ábra).



84. ábra: JYL-279 hatásai a simaizombban lokalizálódó TRPV1-re

A JYL-279 patkány vázizomból izolált arteriolában endogénen expresszáldó TRPV1-re gyakorolt hatásait vizsgáltuk. A bal oldali grafikon a JYL-279 dózis-hatását láthatjuk az erek átmérőváltozására. A középső grafikon a maximális dózisu (1 μ M) JYL-279 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 érhatását mutatja (Czikora et al. 2012).

A következő vegyület az MSK-195 volt, amely viszont a kapszaicinnal mutatott nagy hasonlóságot, attól eltekintve, hogy a 20 perces kezelés alatt teljesen deszenzibilizálta a receptort a kapszaicinre (85. ábra).

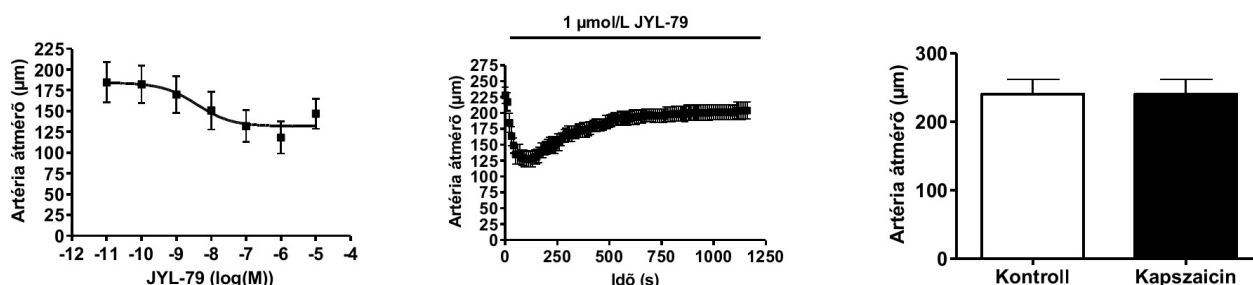


85. ábra: MSK-195 hatásai a simaizombban lokalizálódó TRPV1-re

Az MSK-195 patkány vázizomból izolált arteriolában endogénen expresszáldó TRPV1-re gyakorolt hatásait vizsgáltuk. A bal oldali grafikon az MSK-195 dózis-hatását láthatjuk az erek átmérőváltozására. A középső grafikon a maximális dózisu (1 μ M) MSK-195 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 érhatását mutatja (Czikora et al. 2012).

Az itt tesztelt vegyületek közül az artéria átmérő szabályozásban szerepet játszó TRPV1-re legnagyobb hatékonysággal a JYL-79 hatott (86. ábra). Ezen molekulával való kezelés során az

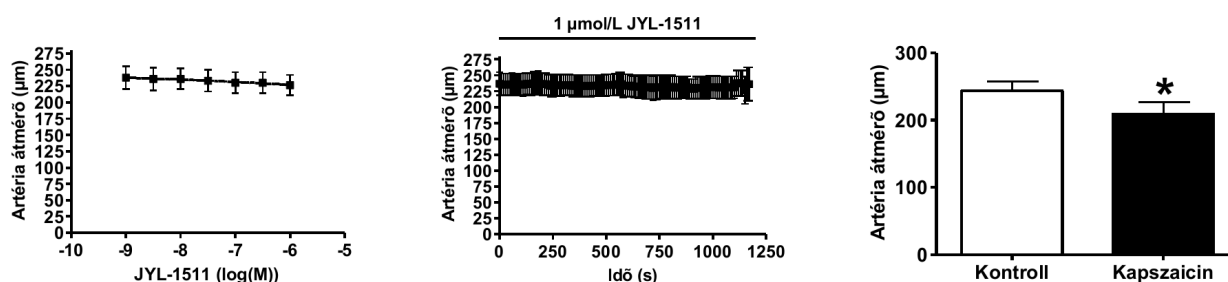
erek a molekula jelenlétében csak részleges akut deszenzibilizációt mutattak, habár a kapszaicin válaszkészségüket a 20 perces kezelés végére teljesen elvesztették.



86. ábra: JYL-79 hatásai a simaizombban lokalizálódó TRPV1-re

A JYL-79 patkány vázizomból izolált arteriolában endogénen expresszáldó TRPV1-re gyakorolt hatásait vizsgáltuk. A bal oldali grafikon a JYL-79 dózis-hatását láthatjuk az erek átmérőváltozására. A középső grafikon a maximális dózisu (1 μM) JYL-79 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 érhataát mutatja (Czikora et al. 2012).

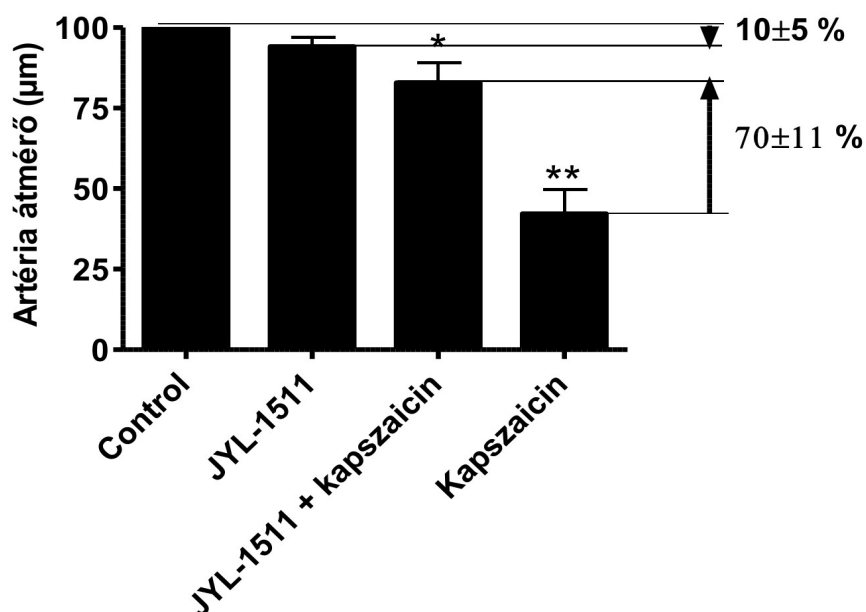
Annak érdekében, hogy a vaszkuláris TRPV1 deszenzibilizációjához szükséges minimális aktivációs szintet megbecsüljük, a JYL-1511 parciális angonistát is felhasználtuk. Ezen molekula esetében az agonizmus mértéke kezeletlen sejtek esetében mintegy 17% volt (Wang et al. 2003). A vegyület esetében ezzel összhangban igen kismértékű akut hatást láttunk az érátmérőre, azonban a kapszaicinnal meghatározott deszenzibilizáció mértékében részleges hatást kaptunk (87. ábra).



87. ábra: JYL-1511 hatásai a simaizombban lokalizálódó TRPV1-re

A JYL-1511 patkány vázizomból izolált arteriolában endogénen expresszáldó TRPV1-re gyakorolt hatásait vizsgáltuk. A bal oldali grafikon a JYL-1511 dózis-hatását láthatjuk az erek átmérőváltozására. A középső grafikon a maximális dózisu (1 μM) JYL-1511 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 érhatását mutatja (Czikora et al. 2012).

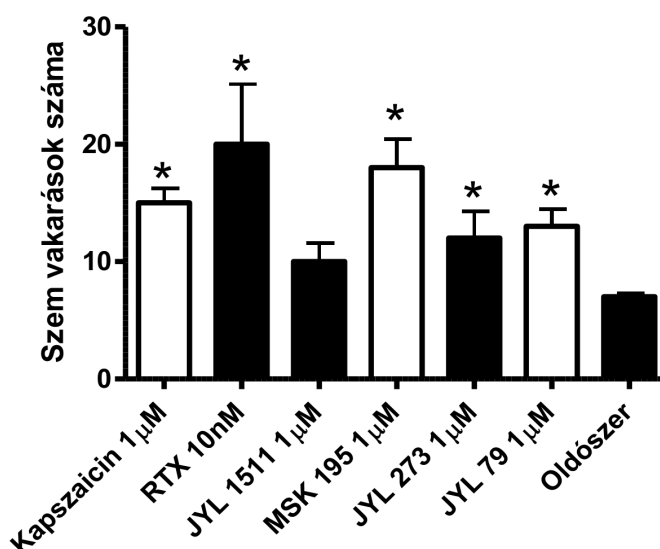
A számszerűsített hatások jó korrelációt mutattak ugyanakkor a korábban *in vitro* meghatározott értékekkel, amennyiben a vegyület által kiváltott agonizmus mintegy 10%-nak, az anagonizmus pedig mintegy 70%-nak adódott (88. ábra).



88. ábra: A JYL-1511 parciális agonista hatásai a vaszkuláris TRPV1-en

A TRPV1 deszezibilizáció vizsgálatára a CHO-TRPV1 sejteken nagyjából 15% agonizmust mutató JYL-1511 hatásait részletesen elemeztük. Az adatok szerint a JYL-1511 számszerűen mintegy 10% érátérő csökkenést okozott, és a vele való kezelést követően a kapszaicin által kiváltott vazokonstrikció mintegy 70%-kal csökkent (Czikora et al. 2012). Ez jó összhangban volt a JYL-1511 CHO-TRPV1 sejtekben mutatott hatékonyságával (27. ábra).

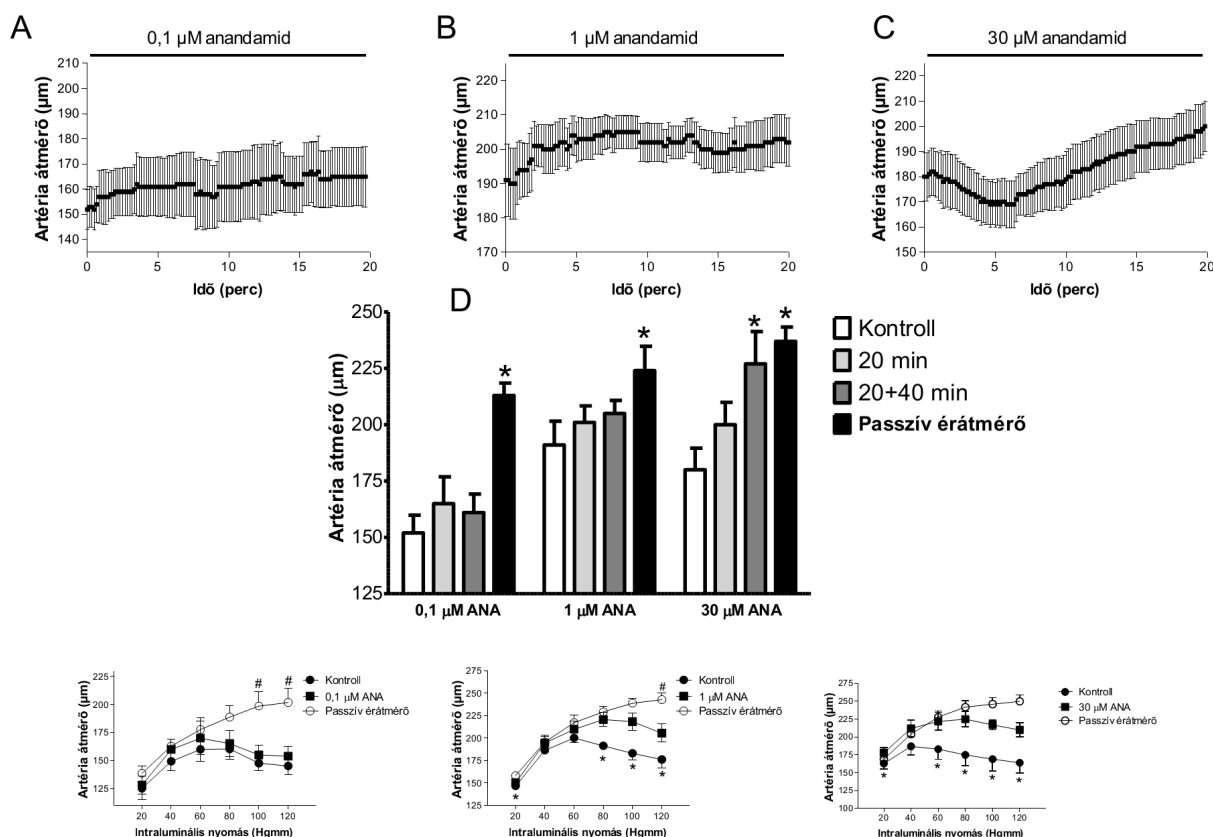
Erőfeszítéseket tettünk a vaszkuláris TRPV1-en kapott struktúra-aktivitás összefüggések összehasonlítására a szenzoros neuronban expresszáldó receptorok hasonló paramétereivel. A szenzoros neuronális funkciót a vegyületek szembe cseppentésével teszteltük, amely kísérlet során az állatok a TRPV1 aktivációt követő irritációval arányosan vakarták a szemüket. A szenzoros neuronon kapott érzékenység adatok alapján a JYL-1511 kivételével minden TRPV1 agonista irritatívnak bizonyult (89. ábra). Ez nem volt teljesen összhangban a vaszkuláris TRPV1-gyel kapott adatokkal, amelyre az ábrán azzal utaltunk, hogy a vaszkuláris receptoron akut hatással nem rendelkező molekulák szenzoros neuronális válaszait kitöltött oszlopokkal mutattuk. Jól látható, hogy az üres és teli oszlopok között nem fedezhető fel összefüggés a szenzoros válaszokat tekintve (89. ábra).



89. 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 kezelések 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 vazoaktív hatásokban a dilatatív válaszok dominálnak, jóllehet magasabb koncentrációban gyakran megfigyelhető egy tranzienst konstriktio is (90. ábra). A dilatáció hátterében az anandamid lebontása állhat, amennyiben az anandamid kiváltotta dilatáció teljes mértékben gátolható volt az anandamidot arachidonsavvá metabolizáló enzim (FAAH) gátlásával (90. ábra).

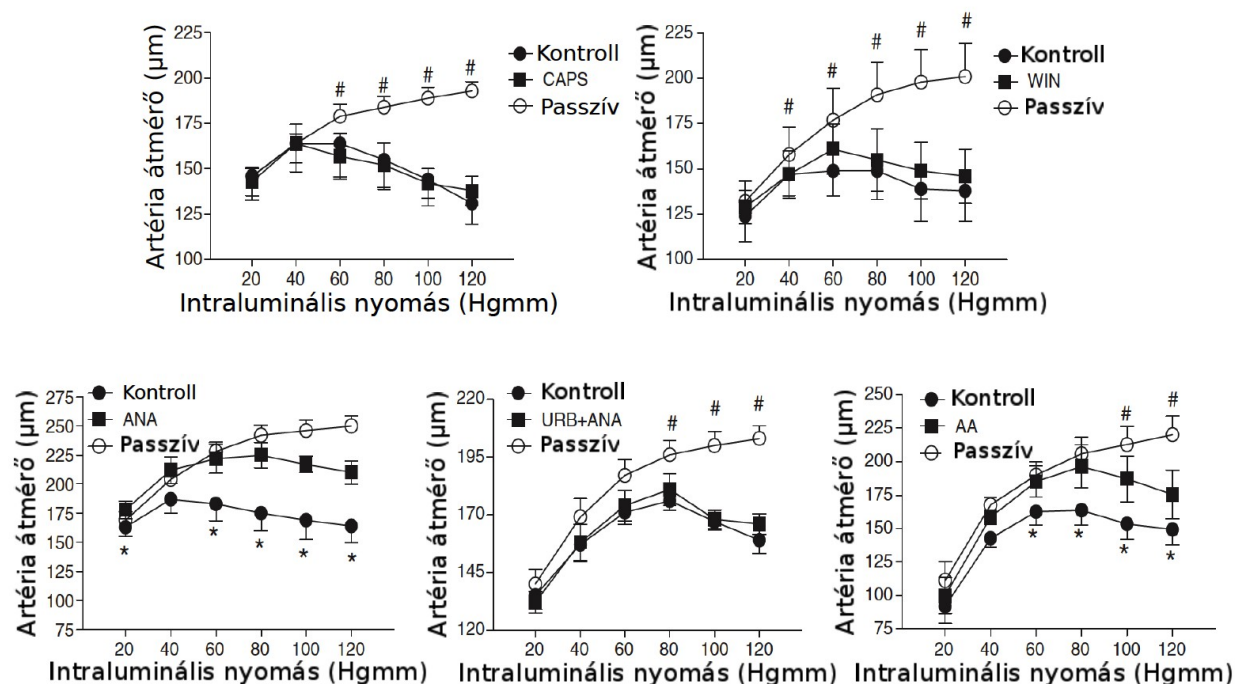


90. ábra: Az anandamid mediált vazodilatációban szerepe van a miogén tónus csökkenésének

Patkány vázizomból izolált artériákat vizsgáltunk egy kanulált rendszeren, ami lehetőséget teremtett az intraluminális nyomás változtatására és az átmérő rögzítésére. A kísérleteket azzal kezdtük, hogy az erek intraluminális nyomás változtatására adott válaszait rögzítettük (alsó grafikonok, kontrollként jelölve a kísérlet előtti értékeket), majd a nyomást 80 Hgmm-re állítottuk. Ezt követően anandamidot adtunk az erekhez (koncentráció a grafikonokon jelölve) és az átmérőt 20 percen keresztül (az anandamid jelenlétében) rögzítettük (felső grafikonok). Ezt követően az anandamidot elmostuk és az ereket 40 percig a fiziológias pufferben inkubáltuk (regeneráció). Végül, az erek intraluminális nyomás változtatására adott válaszait ismét meghatároztuk extracelluláris Ca^{2+} jelenlétében (kitöltött négyzetek, alsó grafikonok), illetve hiányában (üres körök, alsó grafikonok, a 80 Hgmm-es érték a passzív érátmérőt adta a középső grafikonon). A kinetikai adatok rögzítése során 10 másodpercenként mértük az érátmérőt és a felső grafikonokon mutatjuk. Az éráthatás nagyobb időtávban történő megítélése érdekében készítettük a középső grafikont. Itt az anandamid hozzáadását megelőző érátmérőt (kontroll), a 20 perces kezelés végén mért értékeket (20 perc), a 40 perces regenerációt követő érátmérőt (20+40 perc) és a extracelluláris Ca^{2+} hiányában mért értékeket mutatjuk (passzív érátmérő) valamennyi anandamid koncentráció esetében (Czikora et al. 2012).

A további kísérletekben azt vizsgáltuk, hogy az anandamid miogén tónusra gyakorolt hatását milyen receptoron keresztül fejti ki. Ennek érdekében az anandamid hatását vizsgáltuk a lebontását gátló URB jelenlétében, valamint anandamidtól függetlenül TRPV1 (kapszaicin, Caps) és kannabinoid receptorok (WIN) aktiválása mellett, és végül önmagában arachidonsavat alkalmazva

(91. ábra). Eredményeink szerint az anandamid hatását nem TRPV1 és kannabinoid receptorok stimulációja közvetítheti, azonban az anandamid arachidonsavvá történő lebomlásának gátlása felfüggeszti. Mi több, az arachidonsav hatásai nagyon hasonlónak bizonyultak az anandamid hatásaihoz.

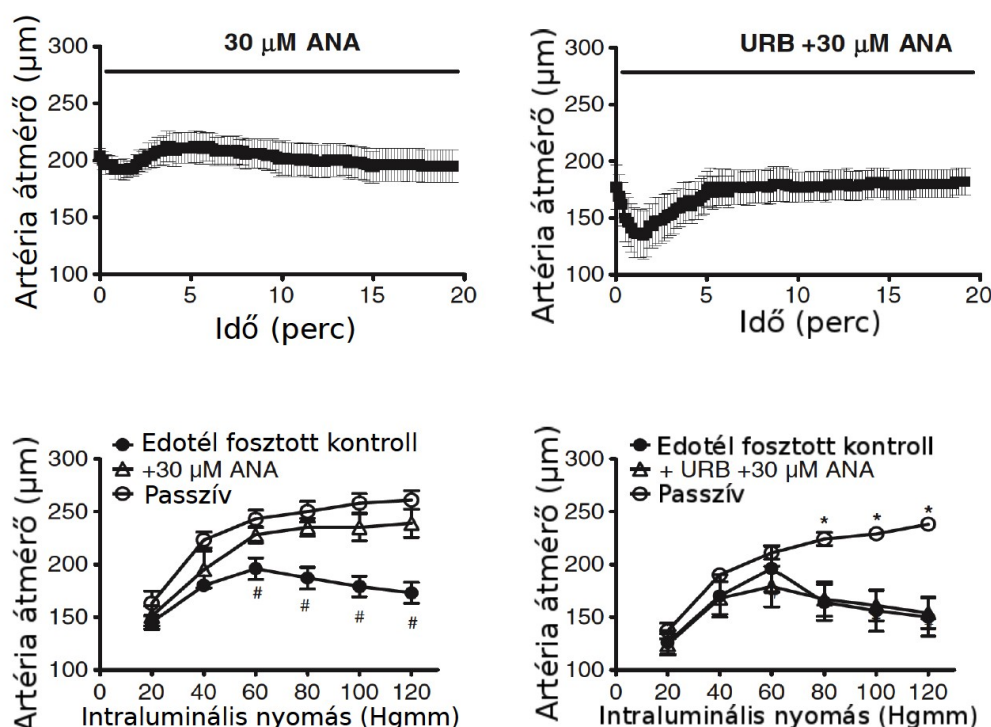


91. ábra: Az anandamid arteriális receptora

Patkány vázizomból izolált artériákat vizsgáltunk egy kanulált rendszeren, ami lehetőséget teremtett az intraluminális nyomás változtatására és az átmérő rögzítésére. A kísérleteket azzal kezdtük, hogy az erek intraluminális nyomás változtatására adott válaszait rögzítettük (kontroll), majd a nyomást 80 Hgmm-re állítottuk. Ezt követően adtuk a jelölt anyagokat az erekhez 20 percig, amit mosás és regeneráció (40 perc) követett. Végül, az erek intraluminális nyomás változtatására adott válaszait ismét meghatároztuk extracelluláris Ca^{2+} jelenlétében (kitöltött négyzetek), illetve hiányában (üres körök) (Czikora et al. 2012).

A kísérletsorozatban erőfeszítéseket tettünk arra, hogy az anandamid arachidonsavvá alakulásában az endotél szerepét vizsgáljuk. Endotél fosztott erekkel végzett kísérletekben az

anandamid hatására nem változott a miogén tónus (92. ábra).



92. ábra: Endotél függő vazodilatáció anandamid hatására

Patkány vázizomból izolált artériákat vizsgáltunk egy kanulált rendszeren, endotél fosztás után. Az endotél fosztás hatékonyságát acetilkolin kiváltott dilatáció hiányával igazoltuk. Az erek intraluminális nyomás változtatására adott válaszait rögzítettük (alsó grafikonok, kontrollként jelölve a kísérlet előtti értékeket), majd a nyomást 80 Hgmm-re állítottuk. Ezt követően anandamidot adtunk az erekhez (koncentráció a grafikonokon jelölve) és az átmérőt 20 percen keresztül (az anandamid jelenlétében) rögzítettük (felső grafikonok). Ezt követően az anandamidot elmostuk és az ereket 40 percig a fiziológiás pufferben inkubáltuk (regeneráció). Végül, az erek intraluminális nyomás változtatására adott válaszait ismét meghatároztuk extracelluláris Ca^{2+} jelenlétében (kitöltött négyzetek, alsó grafikonok), illetve hiányában (üres körök, alsó grafikonok) (Czikora et al. 2012).

A vazodilatatív hatású arachidonsav származék azonosítására is tettünk erőfeszítéseket, de ezen a téren nem sikerült egyértelműen azonosítanunk azt az útvonalat, amely az anandamid esetében a dilatáció kiváltásában elsődleges.

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).

4. Az új eredmények összefoglalása

A TRPV1 egy nemspecifikus 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 vazokonstrikcióhoz vezet. Ezt a hipotézist később farmakológiailag, TRPV1 funkció hiányos egérben és izolált sejteken is megerősítettük. Az arteriális simaizomsejtekben expresszáldó TRPV1 farmakológiai tulajdonságainak feltárását megkezdtuk, 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.

5. Megbeszélés, az eredmények potenciális hasznosítása

A TRPV1 farmakológiai fejlődésének komoly gátját jelenti, hogy a ligandokat fejlesztő cégek egy jelentős része még a klinikai vizsgálatok fázisába eljutott vegyületeinek szerkezetét sem hozza nyilvánosságra. A vonatkozó szabadalmakból csak a vegyületek hozzávetőleges szerkezetét lehet némi szerencsével megismerni (sokszor több száz vegyület szerepel egyetlen szabadalomban, amire a klinikai kutatások során hivatkoznak). Ez láthatólag elfogadott a szellemi jogvédelem területén, azonban a tudományos kutatás vonatkozásában emiatt a szabadalmi védettség bejelentése nem jelenti azt, hogy az adott információ nyilvánosságra kerül. Ennek tükrében viszont nem világos, hogy a tudományos közéletnek és a társadalomnak milyen előnyei származnak abból, hogy a szabadalmat bejelentő kizárólagos jogot kap a nem kellő részletességgel leírt újításának alkalmazására.

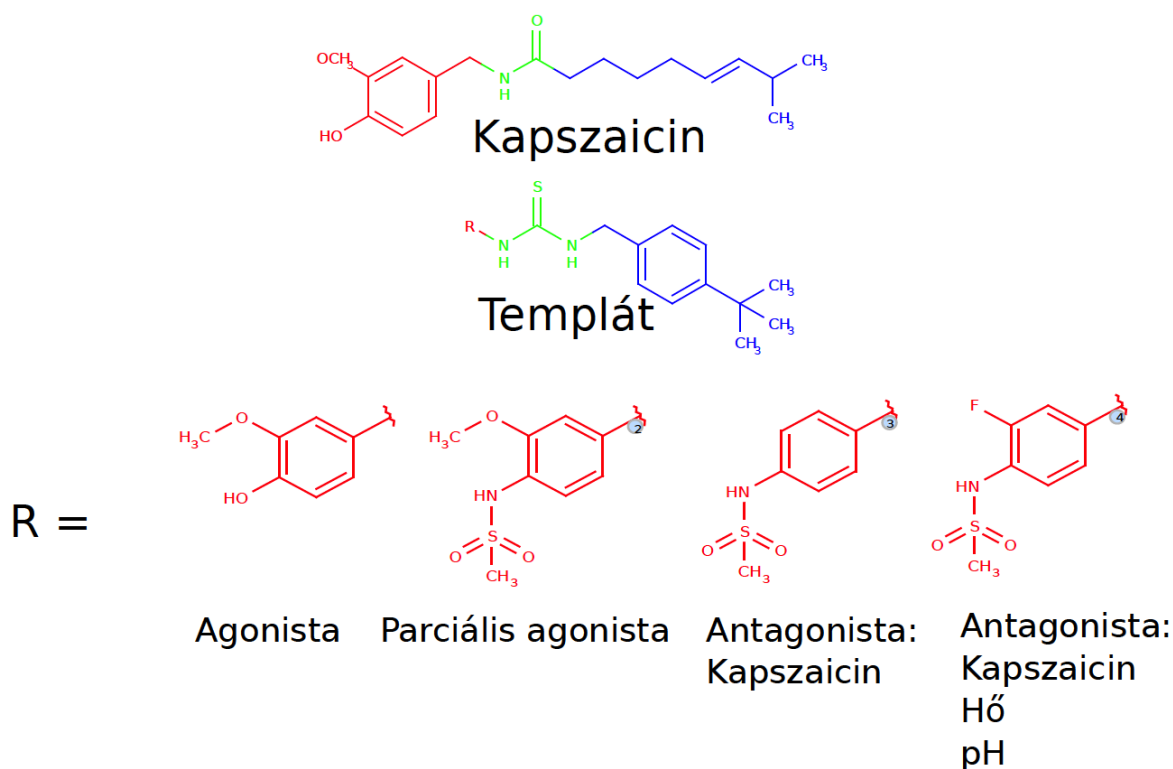
Ezen a területen talán üdítő kivételt jelentett az a farmakológiai program, amihez volt szerencsém csatlakozni. Közreműködésemmel több, mint 250 TRPV1-re ható vegyület szerkezetét, szintézisét és *in vitro* farmakológiai tulajdonságait publikáltuk, számos molekuláris modellel együtt. Ezzel a Peter M. 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 ⁴⁵Ca²⁺ 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. Az egyik általam készített ábra (49. ábra) például egy összegzését adta az addig követett molekuláris farmakológiai irányoknak.

A molekulafejlesztés során a TRPV1 ligandokat általában kémiai értelemben jellemző régiókra szokás osztani (7. ábra). Közleményeinkben és a mindennapi erőfeszítések során is a

dc_652_12

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 (93. 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. Más szavakkal: hatékony agonista struktúrákat jó eséllyel lehet antagonistá hatású vegyületekké konvertálni egyszerű kémiai reakciókkal. Ez véleményem szerint nagyon fontos eszközt adhat az ezzel élő molekuláris farmakológusok kezébe.

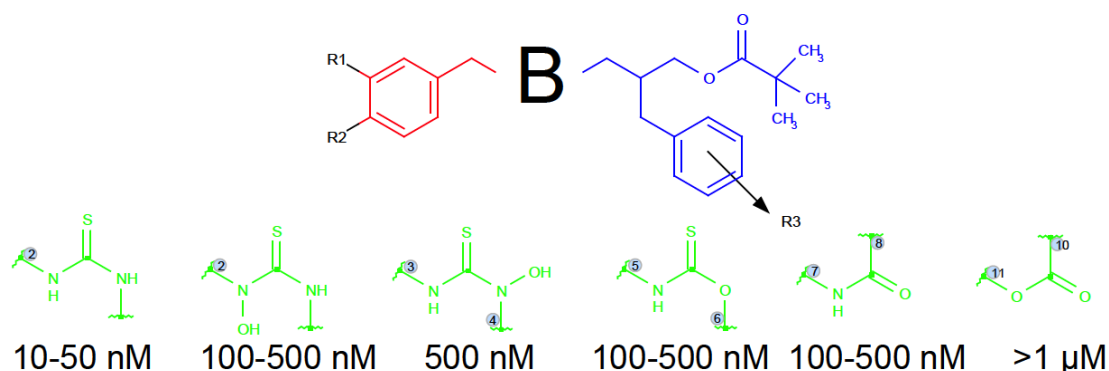


93. ábra: Az "A" régió szerepe az agonizmus-antagonizmus meghatározásában

Az ábrán feltüntetett struktúrájú templátot felhasználva vizsgáltuk az „A” régió módosításainak hatását a biológiai aktivitásra. A különböző funkciós csoportok változtatásával a hatékonyság érdemi változása nélkül lehetett a hatást az agonizmustól az antagonizmusig terjedő skálán változtatni.

A „B” régió jobbára az a kapcsoló régió, amelyben az „A” és „C” régióban használt molekuláris struktúrákat reakcióképes kémiai csoportokkal összekötik. Ennek megfelelően a „B”

régió szerkezete meghatározhatja azt a funkcionális csoportot, amelyet a másik két régióban kívánatos szerkezethez szintetizálnak. A „B” régió vizsgálata során alapvetően két molekulatervezési stratégia létezik: az egyik a „B” régió stabilizálása kötött térszerkezet kialakításával (lásd capsazepine, 8. ábra), a másik stratégia pedig ezen régiók flexibilis csoportokkal történő kitöltése. Az utóbbi stratégia nagyobb szabadságot ad a vegyészeknek a különböző „A” és „B” régiók terezésénél, szintézisénel, és mi saját programunkban ezt preferáltuk, jóllehet, ennek komoly következményei lehetnek. A „B” régió tervezésénél ugyanis a két fentebb említett stratégia mögött egy fontos farmakológiai cél is meghúzódik: a reakcióképes struktúrák kapcsolódása révén metabolikusan labilis molekulák jöhetnek létre. Így a könnyebb szintézis eredménye gyorsabb metabolizmus lehet a szervezeten belül. Saját molekuláinkkal kapott eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy a tiourea templát rendelkezett a legnagyobb hatékonysággal, de más molekuláris struktúrák is sikeresek lehetnek bizonyos esetekben (94. ábra).



94. ábra: Az optimális "B" régióról alkotott képünk

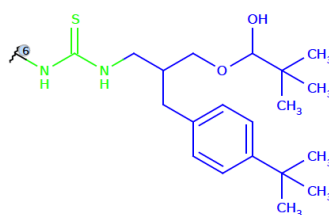
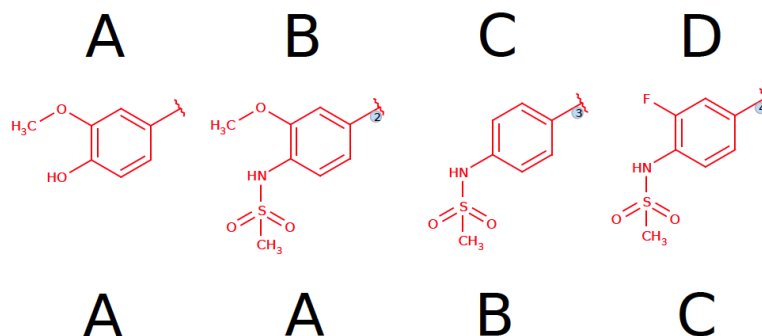
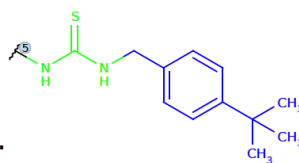
Végül, a „C” régió szerepéről általánosságban megállapítottuk, hogy a molekulák hatékonyságának szabályozása mellett részt vesz a biológiai hatás kialakításában is. A kapott adatok alapján bizonyos struktúrák árnyalni képesek az „A” régió térszerkezete alapján sugallt hatást (95. ábra).

A: Agonista

B: parciális agonista

C: antagonista: vanilloid

D: antagonista: vanilloid, pH, hő...



95. 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 penetrációjának kérdése azáltal merült fel, hogy a resiniferatoxin azonosítását követően világossá vált, hogy az 50 pM K_d értékkel rendelkező resiniferatoxin jobbra nanomoláris tartományban fejt ki hatásait a receptor aktivitására, továbbá, hogy a kapszaicin ezzel szemben 50 nM körüli EC₅₀ értékkel aktiválja a TRPV1-et, de csak mikromólos tartományban képes a receptorról leszorítani a [³H]RTX-et (Acs et al. 1996). Ennek magyarázatára először Blumberg és munkatársai két receptor létét javasolták, egy R (resiniferatoxin) és egy C (kapszaicin) receptorét, melyek külön entitások és ezen vanilloidok iránti érzékenységük alapján megkülönböztethetőek (Szallasi, Blumberg 1999). Ez a viszonylag nagy visszhangot kapott elképzelés igen hamar hamisnak bizonyult (a helyzetet bemutató kiforrott összefoglalóért lásd (Szolcsányi, Sándor 2012), amit Blumberg és munkatársai is elismertek (Szallasi et al. 1999). A funkcionális mérésekben és a [³H]RTX-re alapozott kompetíciós kötődési kísérletekben megmutatkozó különbségek magyarázatára számos további elmélet született, amelyek a TRPV1 modalitásaira, illetve a ligandok kémiai szerkezetére mutattak rá.

Ezen elképzelések egyike, hogy 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 fedezhetőek fel általános viselkedésre utaló szabályszerűségek. Saját vizsgálataimban individuális CHO-TRPV1 sejteket vizsgáltam különböző

agonista stimulusokra adott válaszaik alapján (65. 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 kapszaicinnel 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 (63. ábra). 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.

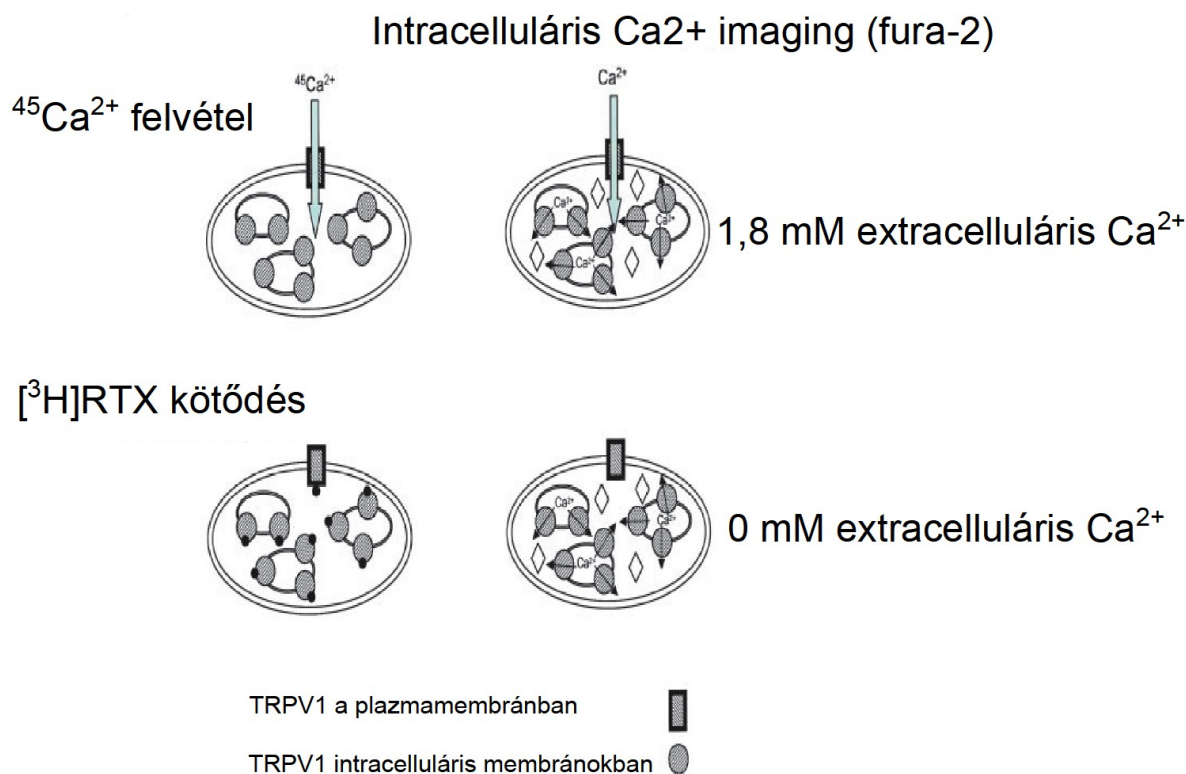
Ez természetesen nem azt jelenti, hogy a ligandok permeabilitása nem jelenthet gátat a TRPV1-hez történő hozzáférésben. Ami azt illeti, ezzel kapcsolatos saját eredményeink is azt sugallják, hogy a lassan diffundáló vegyületek esetében a rövid ideig tartó, deszenzibilizációval komplikált funkcionális mérések jelentősen alulbecsülhetik a molekula hatékonyságát. Konkrét példával élve az I-RTX hatékonysága a kapszaicinnel együtt alkalmazva 1,5 nM-nak tűnik, míg a sejteket a kapszaicin alkalmazás előtt 2 óráig inkubálva ugyanazzal az anyaggal a látszólagos hatékonyság 4,2 pM-ra (majdnem három nagyságrenddel) csökkent (Lazar et al. 2006).

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 elképzelés 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 és munkatársai (Szőke et al. 2010) leírták, hogy a koleszterin kivonás, szfingomielináz kezelés, illetve a gangliozid bioszintézis gátlása egyaránt befolyásolhatja a TRPV1 válaszkészséget. Érdekes, hogy a kezelések egy része nem egyformán hatott CHO sejtekben expresszált receptoron és tenyésztett trigeminális neuronokon, ami arra utal, hogy ezen lipidek mellett még további faktorok is szerepet játszhatnak a TRPV1 regulációjában. Eszerint a TRPV1 mikrokörnyezetében lévő lipid komponensek nem csak a receptor gátlásáért lehetnek felelősek (Prescott, David Julius 2003), hanem annak ligand szenzitivitásáért is, ezzel egy újabb rétegét adva a multimodalitásnak.

A lipid-fehérje interakciók fontos szerepet játszanak a fehérjék sejten belüli lokalizációjának, funkciójának szabályozásában. Ennek bizonyítéka a lipid-kötő domének nagy száma és a lipid-fehérje interakciók szerepe számos sejt folyamatban (Lemmon 2008). A TRPV1 esetében a kapszaicin és a resiniferatoxin esetében is magyarázatot jelenthet a kötődési és funkcionális kísérletekben megfigyelt eltérő hatékonyságra, ha feltételezzük, hogy a receptorok eltérő intracelluláris környezetben expresszálódnak. Ebben az esetben az eltérő környezetben lévő TRPV1 regulációja, ligand aktivációja eltérő lehet, például a membránstruktúrák eltérő lipid összetétele, vagy a TRPV1-et is tartalmazó mikrodomének fehérje összetétele miatt.

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 (58. 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 [^3H]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 (96. ábra).



96. ábra: A TRPV1 funkcionális tulajdonságainak mérésére szolgáló eszközök

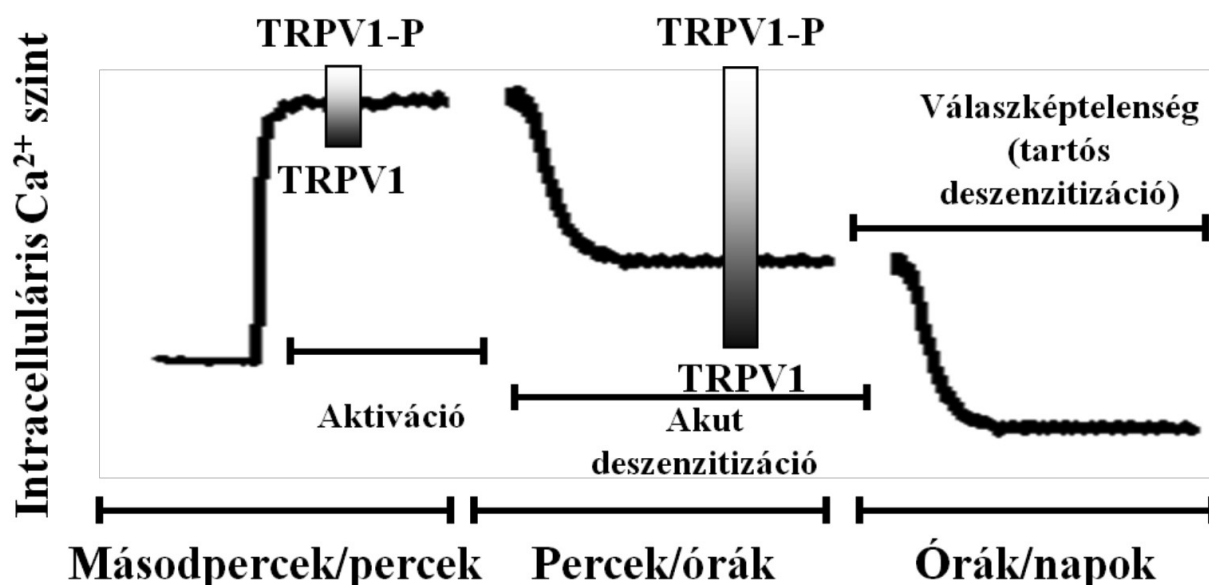
$^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvétellel a sejtmembránon keresztül az extracelluláris tér felől beáramló Ca^{2+} mennyiségét lehet becsülni. Ez a módszer elsősorban a sejtfelszíni TRPV1 aktivitásának mérésére szolgál. A $[\text{H}]\text{RTX}$ kötődés a sejtben jelenlévő összes TRPV1 reakcióját méri. Bizonyos sejtekben, mint a CHO-TRPV1 sejtek ez a nagyfokú intracelluláris expresszió miatt dominálón az intracelluláris TRPV1 populációt jelenti. Az intracelluláris Ca^{2+} mérés a sejtmembránon keresztül beáramló Ca^{2+} mellett az intracelluláris membránokból kiáramló Ca^{2+} -ot is méri. Ezen két hatás közül CHO-TRPV1 sejtekben az extracelluláris Ca^{2+} beáramlása nagyjából a válasz 90%-áért felelős. Ezért fiziológias extracelluláris Ca^{2+} koncentrációk mellett a kapott intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedés jó közelítéssel a plazmamembránban elhelyezkedő TRPV1 funkciójáról nyújt adatokat. Extracelluláris Ca^{2+} hiányában azonban a belső raktárak membránjában elhelyezkedő TRPV1 funkciója is mérhető, jóllehet nagyobb jel-zaj arány mellett. Ezen megfontolások egy része alkalmazható a szenzoros neuronokban expresszáldó TRPV1-re is, azonban a neuronális terminálisokban az intracelluláris Ca^{2+} raktárak léte és szerepe kérdéses. A simaizmokban expresszáldó TRPV1 eloszlása adataink szerint jobban hasonlít a CHO-TRPV1 sejtekére.

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). Ez utalhat

arra, hogy a CHO-TRPV1 sejtek plazmamembránjában expresszáldó receptor hasonlít legjobban az élő állat fájdalom érzetében szerepet játszó TRPV1-éhez, de lehet annak bizonyítéka is, hogy a szenzoros neuron terminálisokban egyszerűen nincs jelen TRPV1-et tartalmazó endoplazmatikus membránrendszer. Adataink és a hipotézisünk összhangban vannak korábban közölt adatokkal. Így például igazolták, hogy az intracelluláris Ca^{2+} raktáraknak szerepe lehet a hátsógyöki ganglionok TRPV1 mediált válaszaiban (Liu et al. 2003). Kárai és munkatársai az általunk javasolthoz nagyon hasonló mechanizmust írtak le, jóllehet a kísérleteikben használt mikromoláris dózisú kapszaicin miatt a kapott válaszok TRPV1 specifitása kérdéses (Kárai et al. 2004). Az intracelluláris TRPV1 szerepe a szenzoros neuronok végződéseiben tehát intracelluláris membránok hiányában jelentősen különbözhet ugyanazon sejtek sejtestétjétől, melyet a legtöbb *in vitro* kísérletben karakterizálnak. Ugyanakkor azt is meg kell említeni, hogy a TRPV1 nem feltétlenül csak szenzoros neuronokban expresszáldik. Saját adataink szerint például arteriális simaizomsejtekben is jelen van, ahol immunhisztokémiai módszerekkel a CHO-TRPV1 sejtekben láthatóhoz nagyon hasonlóan dominálónan intracelluláris lokalizációban található.

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 hatásereőségű 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 (97. ábra).



97. 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.

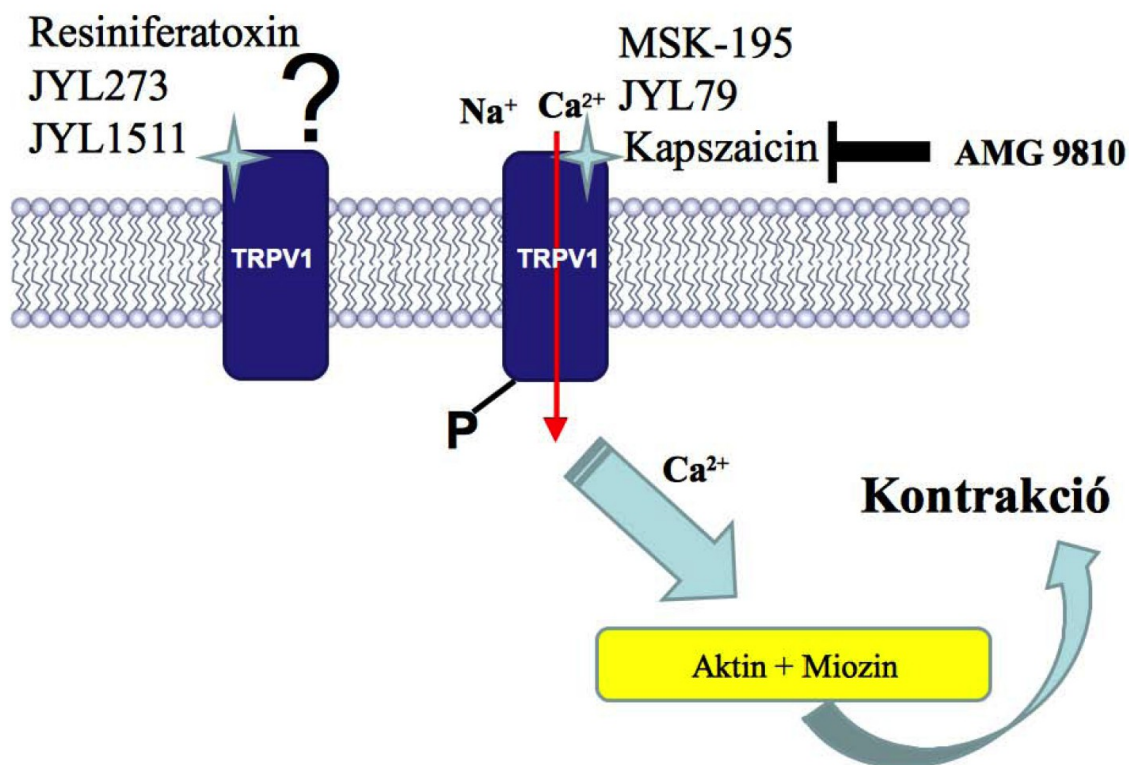
Végül, hazai kutatásaim talán legfontosabb eredménye a TRPV1 arteriális simaizmokban történő funkcionális expressziójának kimutatása volt. A TRPV1 kutatásának igen nagy lökést jelentett a TRPV1 klónozása, azonban az eredeti közlemény zsenialitása mellett félrevezető volt, hogy a TRPV1 expresszióját kizárólag a szenzoros neuronokban írták le és a receptor funkcióit is csak ennek tükrében tárgyalták (Caterina et al. 1997; 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 konstriktív 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 (Pórszász et al. 2002), patkány koronáriákon (Szolesányi 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 vázizomerekekben 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 expresszáldódik és így aktivációja közvetlenül vezet el az összehúzóódáshoz szükséges intracelluláris Ca^{2+} emelkedéshez (98. ábra).



98. ábra: Az arteriális TRPV1 farmakológiája

Az általunk vizsgált TRPV1 ligandok egy része képes volt a arteriális simaizomban expresszáldó TRPV1-et aktiválva intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedést és vazokonstriktiót kiváltani (MSK-195, JYL-79, kapszaicin). Ezen vazokonstriktió nem volt jelen TRPV1 génhiányos ($^{-/-}$) egérben és kompetitíven gátolható volt a TRPV1 antagonistá AMG9810-zel. A TRPV1 aktivációja a csatorna nyitásával párhuzamosan az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedésével jár, ami az aktin-miozin interakción keresztül a miozin ATP-áz aktivitásának növekedéséhez és így a simaizomsejtek összehúzóódásával jár. A sejtek összehúzóódása az artéria szintjén átmérőcsökkenésben (konstriktió) jelentkezik. Ugyanakkor más, szenzoros neuronokon hatékony ligandok esetében (resiniferatoxin, JYL-273) nem kaptunk számottevő hatást az érátmérőben. Ennek oka még nem kellően tisztázott.

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 promotor aktiválódását érzékenyen mutató GFP expressziós

transzgén egérben kapott eredményekkel (Cavanaugh et al. 2011), jöllehet Cavanaugh és munkatársai nem tudták az endogénen expresszálo 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 expresszálódo 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 expresszálódo 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 válaszkésztséget, 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 lokalizálódo 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 konstrikiót vált ki kutyákban, egérben és patkányban (eddig nem publikált adatunk).

Itt kell azt is megjegyezmem, 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 vazokonstriktációt látunk. Ott, ahol az innerváció jelentős és a simaizmokban lévő TRPV1 expresszió alacsony (például a bőr külső rétegeiben) a TRPV1 lokális stimulációjának hatása vazodilatáció.

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.

dc_652_12

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.

6. Irodalomjegyzék

- Acs, G. et al., 1996. Distinct structure-activity relations for stimulation of ^{45}Ca uptake and for high affinity binding in cultured rat dorsal root ganglion neurons and dorsal root ganglion membranes. *Brain research. Molecular brain research*, 35(1-2), 173–82.
- Ahern, G.P., Wang, X., Miyares, R.L., 2006. Polyamines are potent ligands for the capsaicin receptor TRPV1. *The Journal of biological chemistry*, 281(13), 8991–5.
- Akerman, S., Kaube, H., Goadsby, P.J., 2004. Anandamide acts as a vasodilator of dural blood vessels in vivo by activating TRPV1 receptors. *British journal of pharmacology*, 142(8), 1354–1360.
- Bessac, B.F., Jordt, S.-E., 2008. Breathtaking TRP channels: TRPA1 and TRPV1 in airway chemosensation and reflex control. *Physiology Bethesda Md*, 23(6), 360–370.
- Bevan, Stuart et al., 1992. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *British journal of pharmacology*, 107(2), 544–552.
- Bevan, Stuart, Geppetti, P., 1994. Protons: small stimulants of capsaicin-sensitive sensory nerves. *Trends in neurosciences*, 17(12), 509–12.
- Bhave, G. et al., 2002. cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron*, 35(4), 721–31.
- Bingham, B. et al., 2009. The molecular basis of pain and its clinical implications in rheumatology. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, 5(1), 28–37.
- Bisogno, T. et al., 2001. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *British journal of pharmacology*, 134(4), 845–852.
- Brauchi, S. et al., 2007. Dissection of the components for PIP₂ activation and thermosensation in TRP channels. C. Block, S. Parris, eds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(24), 10246–10251.
- Cameron-Smith, D. et al., 1990. Capsaicin and dihydrocapsaicin stimulate oxygen consumption in the perfused rat hindlimb. *International Journal of Obesity*, 14(3), 259–270.
- Canver, C.C., Cooler, S.D., Saban, R., 1997. Neurogenic vasoreactive response of human internal thoracic artery smooth muscle. *The Journal of surgical research*, 72(1), 49–52.
- Caterina, M.J. et al., 2000. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, 288(5464), 306–313.
- Caterina, M.J. et al., 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389(6653), 816–824.
- Cavanaugh, D.J. et al., 2011. Trpv1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arteriolar smooth muscle cells. *The Journal of neuroscience*, 31(13), 5067–77.
- Choi, H.-K. et al., 2009. Non-vanillyl resiniferatoxin analogues as potent and metabolically stable transient receptor potential vanilloid 1 agonists. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(2), 690–8.
- Chu, C.J. et al., 2003. N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces

- hyperalgesia. *The Journal of biological chemistry*, 278(16), 13633–9.
- Chung, J.-U. et al., 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, Á., Lizanecz, E., Bakó, P., et al., 2012. Structure-activity relationships of vanilloid receptor agonists for arteriolar TRPV1. *British journal of pharmacology*, 165(6), 1801–12.
- Czikora, Á., Lizanecz, E., Boczán, J., et al., 2012. Vascular metabolism of anandamide to arachidonic acid affects myogenic constriction in response to intraluminal pressure elevation. *Life sciences*, 90(11-12), 407–15.
- Dedov, V.N. et al., 2002. Gingerols: a novel class of vanilloid receptor (VR1) agonists. *British journal of pharmacology*, 137(6), 793–798.
- Docherty, R.J. et al., 1996. Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin-evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats. *Pflugers Archiv European journal of physiology*, 431(6), 828–837.
- Donnerer, J., Lembeck, F., 1982. Analysis of the effects of intravenously injected capsaicin in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 320(1), 54–57.
- Dux, M., Sántha, P., Jancsó, G., 2003. Capsaicin-sensitive neurogenic sensory vasodilatation in the dura mater of the rat. *The Journal of Physiology*, 552(Pt 3), 859–867.
- Edvinsson, L. et al., 1990. Cerebrovascular responses to capsaicin in vitro and in situ. *British journal of pharmacology*, 100(2), 312–318.
- Escott, K.J. et al., 1995. The involvement of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P in feline pial artery diameter responses evoked by capsaicin. *Neuropeptides*, 29(3), 129–135.
- Fang, L. et al., 2002. Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II contributes to spinal cord central sensitization. *Journal of Neuroscience*, 22(10), 4196–4204.
- Garami, A. et al., 2010. Contributions of different modes of TRPV1 activation to TRPV1 antagonist-induced hyperthermia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(4), 1435–40.
- Gavva, N.R. et al., 2004. Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. *The Journal of biological chemistry*, 279(19), 20283–95.
- Gunthorpe, Martin J et al., 2002. The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23(4), 183–191.
- Gunthorpe, Martin J, Chizh, B.A., 2009. Clinical development of TRPV1 antagonists: targeting a pivotal point in the pain pathway. *Drug Discovery Today*, 14(1-2), 56–67.
- Harris, D. et al., 2002. Characterization of vasorelaxant responses to anandamide in the rat mesenteric arterial bed. *The Journal of physiology*, 539(Pt 3), 893–902.
- Hayes, P. et al., 2000. Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain*, 88(2), 205–215.
- Hopps, J.J., Dunn, W.R., Randall, M.D., 2012. Vasorelaxation to capsaicin and its effects on calcium influx in arteries. *European journal of pharmacology*, 681(1-3), 88–93.
- Huang, S.M. et al., 2002. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(12), 8400–5.

- Hwang, S.W. et al., 2000. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(11), 6155–60.
- Högyes, A., 1878. Beitrage zur physiologischen Wirkung der Bestandteile des Capsicum annum. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 9, 13.
- Jancso, G., Kiraly, E., Jancso-Gabor, A., 1977. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature*, 270(5639), 741–743.
- Jancsó, N., 1960. Role of nerve terminals in the mechanism of inflammatory reactions. *Bull. Millard Fillmore Hosp. Buffalo*, 7, 4.
- Jancsó, N., Jancso-Gabor, Aranka, Szolcsanyi, J., 1968. The role of sensory nerve endings in neurogenic inflammation induced in human skin and in the eye and paw of the rat. *Br J Pharmacol Chemother*, 33(1), 32–41.
- Jancsó, N., Jancsó-Gábor, A., Szolcsányi, J., 1967. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol Chemother*, 31(1), 138–151.
- Jessell, T.M., Iversen, L.L., Cuello, A.C., 1978. Capsaicin-induced depletion of substance P from primary sensory neurones. *Brain research*, 152(1), 183–8.
- Jordt, S.-E., Julius, David, 2002. Molecular basis for species-specific sensitivity to “hot” chili peppers. *Cell*, 108(3), 421–430.
- Jordt, S.-E., Tominaga, M., Julius, David, 2000. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(14), 8134–8139.
- Jung, Jooyoung et al., 2004. Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(8), 7048–7054.
- Kark, T. et al., 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.
- Keeble, J.E., Brain, Susan Diana, 2006. Capsaicin-induced vasoconstriction in the mouse knee joint: a study using TRPV1 knockout mice. *Neuroscience letters*, 401(1-2), 55–8.
- Khairatkar-Joshi, N., Szallasi, Árpád, 2009. TRPV1 antagonists: the challenges for therapeutic targeting. *Trends in Molecular Medicine*, 15(1), 14–22.
- Kitaguchi, T., Swartz, K.J., 2005. An inhibitor of TRPV1 channels isolated from funnel Web spider venom. *Biochemistry*, 44(47), 15544–9.
- Kobayashi, Y. et al., 2001. Capsaicin-like anti-obese activities of evodiamine from fruits of *Evodia rutaecarpa*, a vanilloid receptor agonist. *Planta Medica*, 67(7), 628–633.
- Kárai, L.J. et al., 2004. Vanilloid receptor 1 regulates multiple calcium compartments and contributes to Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in sensory neurons. *The Journal of biological chemistry*, 279(16), 16377–87.
- Lazar, J. et al., 2006. Kinetics of penetration influence the apparent potency of vanilloids on TRPV1. *Molecular pharmacology*, 69(4), 1166–73.
- Lee, J.H. et al., 2011. Structural insights into transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) from homology modeling, flexible docking, and mutational studies. *Journal of computer-aided*

- Lee, Jeewoo, Kang, S.-U., 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, S.-U., Choi, H.-K., et al., 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, Jin, Mi-Kyoung, et al., 2005. Analysis of structure-activity relationships for the “B-region” of N-(4-*t*-butylbenzyl)-N’-[4-(methylsulfonylamino)benzyl]-thiourea analogues as TRPV1 antagonists. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 15(18), 4143–50.
- Lee, Jeewoo, Kim, S.Y., Lee, Jiyoung, et al., 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 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.
- Lee, Jeewoo, Kang, S.-U., Lim, J.-O., et al., 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, S.Y., Park, S., et al., 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.
- Lembeck, F., Holzer, P., 1979. Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn-Schmiedeberg’s archives of pharmacology*, 310(2), 175–83.
- Lemmon, M.A., 2008. Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(2), 99–111.
- Lim, J.-O. et al., 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.
- Liu, M. et al., 2003. Versatile regulation of cytosolic Ca²⁺ by vanilloid receptor I in rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of biological chemistry*, 278(7), 5462–72.
- Lizanecz, E. et al., 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.
- Lopshire, J.C., Nicol, G.D., 1998. The cAMP transduction cascade mediates the prostaglandin E₂ enhancement of the capsaicin-elicited current in rat sensory neurons: whole-cell and single-channel studies. *Journal of Neuroscience*, 18(16), 6081–6092.
- McIntyre, P. et al., 2001. Pharmacological differences between the human and rat vanilloid receptor 1 (VR1). *British journal of pharmacology*, 132(5), 1084–1094.
- Mohapatra, Durga P, Nau, C., 2003. Desensitization of capsaicin-activated currents in the vanilloid

receptor TRPV1 is decreased by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 50080–50090.

- Mohapatra, Durga Prasanna, Nau, C., 2005. Regulation of Ca²⁺-dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(14), 13424–13432.
- Naj, A., 1992. *Peppers: a story of hot pursuits*, New York (USA) ET - 1st: Knopf.
- Nelson, E.K., 1919. The constitution of capsaicin—the pungent principle of capsicum. *J Am Chem Soc*, 41, 2.
- Numazaki, M. et al., 2003. Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(13), 8002–8006.
- Olah, Z., Karai, L., Iadarola, M.J., 2002. Protein kinase C(alpha) is required for vanilloid receptor 1 activation. Evidence for multiple signaling pathways. *The Journal of biological chemistry*, 277(38), 35752–9.
- O’Sullivan, S.E.S., Kendall, D.A., Randall, M.D., 2004. Heterogeneity in the mechanisms of vasorelaxation to anandamide in resistance and conduit rat mesenteric arteries. *British journal of pharmacology*, 142(3), 435–42.
- Park, C.-K. et al., 2011. Resolvin D2 is a potent endogenous inhibitor for transient receptor potential subtype V1/A1, inflammatory pain, and spinal cord synaptic plasticity in mice: distinct roles of resolvin D1, D2, and E1. *The Journal of neuroscience*, 31(50), 18433–8.
- Pearce, L. V et al., 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.
- De Petrocellis, L. et al., 2004. Actions of two naturally occurring saturated N-acyldopamines on transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels. *British journal of pharmacology*, 143(2), 251–6.
- Premkumar, L.S., Ahern, G.P., 2000. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature*, 408(6815), 985–990.
- Prescott, E.D., Julius, David, 2003. A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science*, 300(5623), 1284–1288.
- Pórszász, Robert et al., 2002. Capsaicin-induced nonneural vasoconstriction in canine mesenteric arteries. *European journal of pharmacology*, 441(3), 173–5.
- Ralevic, V. et al., 2001. Cannabinoid activation of recombinant and endogenous vanilloid receptors. *European journal of pharmacology*, 424(3), 211–9.
- Remadevi, R., Szallasi, Árpád, 2008. Adlea (ALGRX-4975), an injectable capsaicin (TRPV1 receptor agonist) formulation for long-lasting pain relief. *IDrugs*, 11(2), 120–32.
- Ryu, HyungChul et al., 2008. Stereospecific high-affinity TRPV1 antagonists: chiral N-(2-benzyl-3-pivaloyloxypentyl) 2-[4-(methylsulfonylamino)phenyl]propionamide analogues. *Journal of medicinal chemistry*, 51(1), 57–67.
- Ryu, S., Liu, B., Qin, F., 2003. Low pH potentiates both capsaicin binding and channel gating of VR1 receptors. *The Journal of general physiology*, 122(1), 45–61.
- Scotland, R., Chauhan, S., Davis, C., 2004. Vanilloid Receptor TRPV1, Sensory C-Fibers, and Vascular Autoregulation A Novel Mechanism Involved in Myogenic Constriction. *Circulation*

..., 95(10), 1027–34.

Scoville, W.L., 1912. Note on capsicum. *J Am Pharm Assoc*, 1, 1.

Spaeth, E., Darling, S., 1993. Synthesis of capsaicin. *Ber Chem Ges*, 63B, 3.

Sun, W. et al., 2012. 2-(4-Methylsulfonylaminophenyl) propanamide TRPV1 antagonists: Structure-activity relationships in the B and C-regions. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20(3), 1310–8.

Szallasi, Á et al., 1991. Inhibition of [3H]resiniferatoxin binding to rat dorsal root ganglion membranes as a novel approach in evaluating compounds with capsaicin-like activity. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 344(5), 551–556.

Szallasi, Árpád, Szabó, T., et al., 1999. Resiniferatoxin-type phorboid vanilloids display capsaicin-like selectivity at native vanilloid receptors on rat DRG neurons and at the cloned vanilloid receptor VR1. *British journal of pharmacology*, 128(2), 428–434.

Szallasi, Árpád, Blumberg, P.M., et al., 1999. The cloned rat vanilloid receptor VR1 mediates both R-type binding and C-type calcium response in dorsal root ganglion neurons. *Molecular pharmacology*, 56(3), 581–7.

Szallasi, Árpád, Biro, T., Szabo, Tamás, 2009. A non# pungent triprenyl phenol of fungal origin, scutigeral, stimulates rat dorsal root ganglion neurons via interaction at vanilloid receptors. *British journal of ...*, 126(6), 1351–1358.

Szallasi, Árpád, Blumberg, P.M., 1989. Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. *Neuroscience*, 30(2), 515–520.

Szallasi, Árpád, Blumberg, P.M., 1990. Specific binding of resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog, by dorsal root ganglion membranes. *Brain research*, 524(1), 106–11.

Szallasi, Árpád, Blumberg, P.M., 1999. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacological reviews*, 51(2), 159–212.

Szallasi, Árpád, Jonassohn, M., Acs, G., 2012. The stimulation of capsaicin # sensitive neurones in a vanilloid receptor # mediated fashion by pungent terpenoids possessing an unsaturated 1, 4 # dialdehyde moiety. *British journal of ...*, 119(2), 283–290.

Szolcsányi, J. et al., 1988. Selective excitation by capsaicin of mechano-heat sensitive nociceptors in rat skin. *Brain Research*, 446(2), 262–268.

Szolcsányi, J., 1984a. Capsaicin and neurogenic inflammation: history and early findings. In L. Chahl, J Szolcsányi, F. Lembeck, eds. *Antidromic Vasodilatation and Neurogenic Inflammation*. Budapest: Akadémiai Kiadó, 7–26.

Szolcsányi, János, 1984b. Capsaicin-sensitive chemoceptive neural system with dual sensory-efferent function. In L. Chahl, J Szolcsányi, F. Lembeck, eds. *Antidromic Vasodilatation and Neurogenic Inflammation*. Budapest: Akadémiai Kiadó, 27–53.

Szolcsányi, János et al., 2001. Functional and biochemical evidence for capsaicin-induced neural endothelin release in isolated working rat heart. *European journal of pharmacology*, 419(2-3), 215–21.

Szolcsányi, János, Helyes, Z., et al., 1998. Release of somatostatin and its role in the mediation of the anti-inflammatory effect induced by antidromic stimulation of sensory fibres of rat sciatic nerve. *British journal of pharmacology*, 123(5), 936–942.

Szolcsányi, János, Pintér, E., et al., 1998. Systemic anti-inflammatory effect induced by counter-

irritation through a local release of somatostatin from nociceptors. *British journal of pharmacology*, 125(4), 916–922.

- Szolcsányi, János, Jancso-Gabor, Aranka, 1975. Sensory effects of capsaicin congeners I. Relationship between chemical structure and pain-producing potency of pungent agents. *Arzneimittelforschung*, 25(12), 1877–1881.
- Szolcsányi, János, Jancsó-Gábor, A., 1976. Sensory effects of capsaicin congeners II: Importance of chemical structure and pungency in desensitizing activity of capsaicin-type compounds. *Arzneimittelforschung*, 26, 33–37.
- Szolcsányi, János, Sándor, Z., 2012. Multimeric TRPV1 nociceptor: a target for analgesics. *Trends in pharmacological sciences*, 33(12), 646–55.
- Szőke, É. et al., 2000. Interacting effects of capsaicin and anandamide on intracellular calcium in sensory neurones. *Neuroreport*, 11(9), 1949–52.
- Szőke, É. et al., 2010. Effect of lipid raft disruption on TRPV1 receptor activation of trigeminal sensory neurons and transfected cell line. *European journal of ...*, 628(1-3), 67–74.
- Tang, L. et al., 2007. Antinociceptive pharmacology of N-(4-chlorobenzyl)-N'-(4-hydroxy-3-iodo-5-methoxybenzyl) thiourea, a high-affinity competitive antagonist of the transient receptor potential vanilloid 1 receptor. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 321(2), 791–8.
- Thresh, L.T., 1846. Isolation of capsaicin. *Pharm J.*, 6.
- Tominaga, M. et al., 1998. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*, 21(3), 531–543.
- Tóth, A. et al., 2003. Arachidonyl dopamine as a ligand for the vanilloid receptor VR1 of the rat. *Life sciences*, 73(4), 487–98.
- Tóth, A. et al., 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, A. et al., 2005. Different vanilloid agonists cause different patterns of calcium response in CHO cells heterologously expressing rat TRPV1. *Life sciences*, 76(25), 2921–32.
- Tóth, A. et al., 2002. Thapsigargin binds to and inhibits the cloned vanilloid receptor-1. *Biochemical and biophysical research communications*, 293(2), 777–82.
- Tóth, A., Blumberg, P.M., Boczán, J., 2009. Anandamide and the vanilloid receptor (TRPV1). *Vitamins and hormones*, 81, 389–419.
- Vellani, V. et al., 2001. Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *The Journal of Physiology*, 534(Pt 3), 813–25.
- Vriens, J., Appendino, G., Nilius, B., 2009. Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Molecular pharmacology*, 75(6), 1262–79.
- Walker, K.M. et al., 2003. The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 304(1), 56–62.
- Wallace, M., Pappagallo, M., 2011. Qutenza(R): a capsaicin 8% patch for the management of postherpetic neuralgia. *Expert Rev Neurother*, 11(1), 15–27.

dc_652_12

- Wang, Y. et al., 2002. High affinity antagonists of the vanilloid receptor. *Molecular pharmacology*, 62(4), 947–56.
- Wang, Y. et al., 2003. High-affinity partial agonists of the vanilloid receptor. *Molecular pharmacology*, 64(2), 325–33.
- Yang, B.H. et al., 2003. Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol. *Journal of Dental Research*, 82(10), 781–785.
- Zygmunt, P.M. et al., 1999. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, 400(6743), 452–457.

7. Publikációk, szabadalmi beadvány

7.1. Szabadalmi beadvány

Szabadalmi beadvány: P1200299 alapszámú magyar szabadalmi bejelentés „Dilution based inhibitor assay”, 2012. május 18.

7.2. Az értekezésben felhasznált saját közlemények

7.2.1. 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.

7.2.2. 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, Ruzsnaszky, 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, Myoungyoup, 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-t-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 activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 14(9), 2291–7.
- Lee, Jeewoo, Kang, Sang-Uk, Kil, Min-Jung, Shin, Myoungyoup, 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, Jiyoung, 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, Jiyoung, 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, Jiyoung, 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, Jiyou, 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, Jiyou, 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)

Erre kapott összes 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 hivatkozások száma: **159** (ebből 23 az összefoglaló közleményre).

7.3. 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. Thriftene 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, Tóski, 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.
- Kolozsvari, 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, Rózsahegyi, 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**.

7.4 Teljes közleménylista

A Magyar Tudományos Művek Tárába feltöltött adatok szerint 2013. január 26-án:

7.4.1. PhD. fokozat megszerzése előtt

1. Toth A, Kiss E, Gergely P, Walsh MP, Hartshorne DJ, Erdodi F 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) pp. 113-117. (2000) IF: 3.440
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 21 Függő idéző: 8 Összesen: 29
2. Toth A, Kiss E, Herberg FW, Gergely P, Hartshorne DJ, Erdodi F Study of the subunit interactions in myosin phosphatase by surface plasmon resonance EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY 267:(6) pp. 1687-1697. (2000) IF: 2.852
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 30 Függő idéző: 18 Összesen: 48

7.4.2. PhD. fokozat megszerzése után

3. **Toth A**, Kedei N, Szabo T, Wang Y, Blumberg PM Thapsigargin binds to and inhibits the cloned vanilloid receptor-1 BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 293:(2) pp. 777-782. (2002) IF: 2.935
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 21 Függő idéző: 2 Összesen: 23
4. Wang Y, Szabo T, Welter JD, **Toth A**, Tran R, Lee JY, Kang SU, Suh YG, Blumberg PM, Lee J High affinity antagonists of the vanilloid receptor MOLECULAR PHARMACOLOGY 62:(4) pp. 947-956. (2002) IF: 5.480
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 45 Függő idéző: 35 Összesen: 80
5. Barta J, **Toth A**, Jaquet K, Redlich A, Edes I, Papp Z Calpain-1-dependent degradation of troponin I mutants found in familial hypertrophic cardiomyopathy MOLECULAR AND CELLULAR BIOCHEMISTRY 251:(1-2) pp. 83-88. (2003) IF: 1.763
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 5 Függő idéző: 4 Összesen: 9
6. Lee J, Lee J, Kang M, Shin M, Kim JM, Kang SU, Lim JO, Choi HK, Suh YG, Park HG, Oh U, Kim HD, Park YH, Ha HJ, Kim YH, **Toth A**, Wang Y, Tran R, Pearce LV, Lundberg DJ, Blumberg PM 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) pp. 3116-3126. (2003) IF: 4.820
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 52 Függő idéző: 28 Összesen: 80

7. **Toth A**, Kedei N, Wang Y, Blumberg PM Arachidonyl dopamine as a ligand for the vanilloid receptor VR1 of the rat LIFE SCIENCES 73:(4) pp. 487-498. (2003) IF: 1.944
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 34 Függő idéző: 4 Összesen: 38

8. Wang Y, **Toth A**, Tran R, Szabo T, Welter JD, Blumberg PM, Lee J, Kang SU, Lim JO, Lee J High-affinity partial agonists of the vanilloid receptor MOLECULAR PHARMACOLOGY 64:(2) pp. 325-333. (2003) IF: 5.650
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 10 Függő idéző: 17 Összesen: 27

9. Brodie C, Steinhart R, Kazimirsky G, Rubinfeld H, Hyman T, Ayres JN, Hur GM, **Toth A**, Yang DZ, Garfield SH, Stone JC, Blumberg PM PKC delta associates with and is involved in the phosphorylation of RasGRP3 in response to phorbol esters MOLECULAR PHARMACOLOGY 66:(1) pp. 76-84. (2004) IF: 5.080
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 17 Függő idéző: 11 Összesen: 28

10. Gavva NR, Klionsky L, Qu YS, Shi LC, Tamir R, Edenson S, Zhang TJ, Viswanadhan VN, **Toth A**, Pearce LV, Vanderah TW, Porreca F, Blumberg PM, Lile J, Sun Y, Wildt K, Louis JC, Treanor JJS Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1 JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 279:(19) pp. 20283-20295. (2004) IF: 6.355
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 130 Függő idéző: 14 Összesen: 144

11. Kedei N, Lundberg DJ, **Toth A**, Welburn P, Garfield SH, Blumberg PM Characterization of the interaction of ingenol 3-angelate with protein kinase C CANCER RESEARCH 64:(9) pp. 3243-3255. (2004) IF: 7.690
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 51 Függő idéző: 6 Összesen: 57

12. Lee J, Kang SU, Choi HK, Lee J, Lim JO, Kil MJ, Jin MK, Kim KP, Sung JH, Chung SJ, Ha HJ, Kim YH, Pearce LV, Tran R, Lundberg DJ, Wang Y, **Toth A**, Blumberg PM 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 activity BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS 14:(9) pp. 2291-2297. (2004) IF: 2.333
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 3 Függő idéző: 5 Összesen: 8

13. Lee J, Kim SY, Lee J, Kang M, Kil MJ, Cho HK, Jin MK, Wang Y, **Toth A**, Pearce LV, Lundberg DJ, Tran R, Blumberg PM Analysis of structure-activity relationships with the N-(3-acyloxy-2-benzylpropyl)-N'-[4-(methylsulfonylamino)benzyl]thiourea template for vanilloid receptor 1 antagonism BIOORGANIC AND MEDICINAL CHEMISTRY 12:(13) pp. 3411-3420. (2004) IF: 2.185
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 13 Függő idéző: 2 Összesen: 15

14. Lee J, Kim SY, Park S, Lim JO, Kim JM, Kang M, Lee J, Kang SU, Choi HK, Jin MK, Welter JD, Szabo T, Tran R, Pearce LV, **Toth A**, Blumberg PM Structure-activity relationships of simplified resiniferatoxin analogues with potent VR1 agonism elucidates an active conformation of RTX for VR1 binding BIOORGANIC AND MEDICINAL CHEMISTRY 12:(5) pp. 1055-1069. (2004) IF: 2.185
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 5 Függő idéző: 4 Összesen: 9

15. Lee JW, Kang SU, Lim JO, Choi HK, Jin MK, **Toth A**, Pearce LV, Tran R, Wang Y, Szabo T, Blumberg PM N-[4-(methylsulfonylamino)benzyl]thiourea analogues as vanilloid receptor antagonists: analysis of structure-activity relationships for the 'C-Region' BIOORGANIC AND MEDICINAL CHEMISTRY 12:(2) pp. 371-385. (2004) IF: 2.185
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 14 Függő idéző: 2 Összesen: 16

16. **Toth A**, Blumberg PM, Chen ZL, Kozikowski AP Design of a high-affinity competitive antagonist of the vanilloid receptor selective for the calcium entry-linked receptor population MOLECULAR PHARMACOLOGY 65:(2) pp. 282-291. (2004) IF: 5.080
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 16 Függő idéző: 12 Összesen: 28

17. Wang Y, Keddi N, Wang M, Wang QJ, Huppler AR, **Toth A**, Tran R, Blumberg PM Interaction between protein kinase C μ and the vanilloid receptor type 1 JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 279:(51) pp. 53674-53682. (2004) IF: 6.355
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 39 Függő idéző: 8 Összesen: 47

18. Bagi Z, Erdei N, **Toth A**, Li W, Hintze TH, Koller A, Kaley G 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) pp. 1610-1616. (2005) IF: 7.053
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 48 Függő idéző: 9 Összesen: 57

19. Barta J, **Toth A**, Edes I, Vaszily M, Papp JGy, Varro A, Papp Z Calpain-1-sensitive myofibrillar proteins of the human myocardium MOLECULAR AND CELLULAR BIOCHEMISTRY 278:(1-2) pp. 1-8. (2005) IF: 1.681

20. Borbely A, **Toth A**, Edes I, Virag L, Papp JGy, Varro A, Paulus WJ, van Der Velden J, Stienen GJM, Papp Z Peroxynitrite-induced alpha-actinin nitration and contractile alterations in isolated human myocardial cells *CARDIOVASCULAR RESEARCH* 67:(2) pp. 225-233. (2005) IF: 5.283
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 43 Függő idéző: 7 Összesen: 50

21. Lee J, Kang SU, Kil MJ, Shin M, Lim JO, Choi HK, Jin MK, Kim SY, Kim SE, Lee YS, Min KH, Kim YH, Ha HJ, Tran R, Welter JD, Wang Y, Szabo T, Pearce LV, Lundberg DJ, **Toth A**, Pavlyukovets VA, Morgan MA, Blumberg PM 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) pp. 4136-4142. (2005) IF: 2.478
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 10 Függő idéző: 5 Összesen: 15

22. Lee J, Jin MK, Kang SU, Kim SY, Lee J, Shin M, Hwang J, Cho SY, Choi YS, Choi HK, Kim SE, Suh YG, Lee YS, Kim YH, Ha HJ, **Toth A**, Pearce LV, Tran R, Szabo T, Welter JD, Lundberg DJ, Wang Y, Lazar J, Pavlyukovets VA, Morgan MA, Blumberg PM Analysis of structure-activity relationships for the 'B-region' of N-(4-t-butylbenzyl)-N'-[4-(methylsulfonylamino)benzyl]-thiourea analogues as TRPV1 antagonists *BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS* 15:(18) pp. 4143-4150. (2005) IF: 2.478
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 3 Függő idéző: 1 Összesen: 4

23. **Toth A**, Wang Y, Kedei N, Tran R, Pearce LV, Kang SU, Jin MK, Choi HK, Lee J, Blumberg PM Different vanilloid agonists cause different patterns of calcium response in CHO cells heterologously expressing rat TRPV1 *LIFE SCIENCES* 76:(25) pp. 2921-2932. (2005) IF: 2.512
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 24 Függő idéző: 8 Összesen: 32

24. **Toth A**, Boczan J, Kedei N, Lizanecz E, Bagi Z, Papp Z, Edes I, Csiba L, Blumberg P M Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain *MOLECULAR BRAIN RESEARCH* 135:(1-2) pp. 162-168. (2005) IF: 1.585
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 131 Függő idéző: 3 Összesen: 134

25. Erdei N, **Toth A**, Pasztor ET, Papp Z, Edes I, Koller A, Bagi Z 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) pp. H2107-H2115. (2006) IF: 3.724

26. Lazar J, Braun DC, **Toth A**, Wang Y, Pearce LV, Pavlyukovets VA, Blumberg PM, Garfield SH, Wincovitch S, Choi HK, Lee J Kinetics of penetration influence the apparent potency of vanilloids on TRPV1 MOLECULAR PHARMACOLOGY 69:(4) pp. 1166-1173. (2006) IF: 4.469
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 16 Függő idéző: 4 Összesen: 20

27. Lizanecz E, Pasztor ET, Mohacsi A, Papp Z, Edes I, **Toth A** Mistyping angiotensinogen M235T alleles HYPERTENSION RESEARCH 29:(3) pp. 197-201. (2006) IF: 3.177
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 9 Összesen: 9

28. Lizanecz E, Bagi Z, Pasztor E T, Papp Z, Edes I, Kedei N, Blumberg P M, **Toth A** 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) pp. 1015-1023. (2006) IF: 4.469
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 21 Függő idéző: 5 Összesen: 26

29. Molnár A, **Tóth A**, Bagi Z, Papp Z, Édes I, Vasziy M, Galajda Z, Papp JGy, Varró A, Szűts V, Lacza Z, Gerő D, Szabó C Activation of the poly(ADP-ribose) polymerase pathway in human heart failure MOLECULAR MEDICINE 12:(7-8) pp. 143-152. (2006) IF: 2.708
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 20 Függő idéző: 3 Összesen: 23

30. Chung JU, Kim SY, Lim JO, Choi HK, Kang SU, Yoon HS, Ryu H, Kang DW, Lee J, Kang B, Choi S, **Toth A**, Pearce LV, Pavlyukovets VA, Lundberg DJ, Blumberg PM alpha-Substituted N-(4-tert-butylbenzyl)-N'-[4-(methylsulfonylamino)benzyl]thiourea analogues as potent and stereospecific TRPV1 antagonists BIOORGANIC AND MEDICINAL CHEMISTRY 15:(18) pp. 6043-6053. (2007) IF: 2.662
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 10 Függő idéző: 4 Összesen: 14

31. Edes IF, **Toth A**, Csanyi G, Lomnicka M, Chlopicki S, Edes I, Papp Z 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) pp. 363-372. (2008) IF: 5.054
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 1 Függő idéző: 6 Összesen: 7

32. Hegedus E, Imre L, Pataki J, Lizanecz E, Szekvolgyi L, Fazakas F, Bacso Z, **Toth A**, Szabo M,

Seres Z, Szabo G Heteroduplex analysis using flow cytometric microbead assays to detect deletions, insertions, and single-strand lesions CYTOMETRY PART A 73A:(3) pp. 238-245. (2008) IF: 3.259

Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos

Független idéző: 1 Összesen: 1

33. Hertelendi Z, **Toth A**, Borbely A, Galajda Z, van der Velden J, Stienen GJM, Édes I, Papp Z Oxidation of myofilament protein sulfhydryl groups reduces the contractile force and its Ca²⁺ sensitivity in human cardiomyocytes ANTIOXIDANTS AND REDOX SIGNALING 10:(7) pp. 1175-1184. (2008) IF: 6.190
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 12 Független idéző: 1 Összesen: 13

34. Kark T, Bagi Z, Lizanecz E, Pasztor ET, Erdei N, Czikora A, Papp Z, Edes I, Porszasz R, **Toth A** Tissue-specific regulation of microvascular diameter: opposite functional roles of neuronal and smooth muscle located vanilloid receptor-1 MOLECULAR PHARMACOLOGY 73:(5) pp. 1405-1412. (2008) IF: 4.711
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 19 Független idéző: 2 Összesen: 21

35. Pearce LV, **Toth A**, Ryu H, Kang DW, Choi HK, Jin MK, Lee J, Blumberg PM Differential modulation of agonist and antagonist structure activity relations for rat TRPV1 by cyclosporin A and other protein phosphatase inhibitors NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY 377:(2) pp. 149-157. (2008) IF: 2.830
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 2 Független idéző: 2 Összesen: 4

36. Ryu H, Jin MK, Kim SY, Choi HK, Kang SU, Kang DW, Lee J, Pearce LV, Pavlyukovets VA, Morgan MA, Tran R, **Toth A**, Lundberg DJ, Blumberg PM Stereospecific high-affinity TRPV1 antagonists: Chiral N-(2-benzyl-3-pivaloyloxypentyl) 2-[4-(methylsulfonylamino)phenyl]propionamide analogues JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY 51:(1) pp. 57-67. (2008) IF: 4.898
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 9 Független idéző: 4 Összesen: 13

37. Choi HK, Choi S, Lee Y, Kang DW, Ryu H, Maeng HJ, Chung SJ, Pavlyukovets VA, Pearce LV, **Toth A**, Tran R, Wang Y, Morgan MA, Blumberg PM, Lee J Non-vanillyl resiniferatoxin analogues as potent and metabolically stable transient receptor potential vanilloid 1 agonists BIOORGANIC AND MEDICINAL CHEMISTRY 17:(2) pp. 690-698. (2009) IF: 2.822
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 2 Független idéző: 1 Összesen: 3

38. Hertelendi Z, **Tóth A**, Borbely A, Galajda Z, Edes I, Tótsaki A, Papp Z The peroxynitrite evoked contractile depression can be partially reversed by antioxidants in human cardiomyocytes JOURNAL OF CELLULAR AND MOLECULAR MEDICINE 13:(8b) pp.

2200-2209. (2009) IF: 5.228

Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos

Független idéző: 2 Összesen: 2

39. Lim JO, Jin MK, Ryu H, Kang DW, Lee J, Pearce LV, Tran R, **Toth A**, Blumberg PM
Conformationally constrained analogues of N'-(4-tert-butylbenzyl)-N(4-methylsulfonylaminobenzyl)thiourea as TRPV1 antagonists EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY 44:(1) pp. 322-331. (2009) IF: 3.269
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 2 Összesen: 2

40. Molnar A, Borbely A, Czuriga D, Ivetta SM, Szilagyi S, Hertelendi Z, Pasztor ET, Balogh A, Galajda Z, Szerafin T, Jaquet K, Papp Z, Edes I, **Toth A** Protein kinase C contributes to the maintenance of contractile force in human ventricular cardiomyocytes JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 284:(2) pp. 1031-1039. (2009) IF: 5.328
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 6 Függő idéző: 1 Összesen: 7

41. **Toth A**, Blumberg PM, Boczan J Anandamide and the vanilloid receptor (TRPV1) VITAMINS AND HORMONES-ADVANCES IN RESEARCH AND APPLICATIONS 81: pp. 389-419. (2009) IF: 2.439
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 23 Összesen: 23

42. Fedor R, Asztalos L, Lőcsey L, Szabó L, Mányiné IS, Fagyas M, Lizanecz E, **Tóth A** Insertion/Deletion Polymorphism of Angiotensin-Converting Enzyme as a Risk Factor for Chronic Allograft Nephropathy TRANSPLANTATION PROCEEDINGS 42:(6) pp. 2304-2308. (2010) IF: 0.993
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 1 Függő idéző: 1 Összesen: 2

43. Ait Mou Y, **Toth A**, Cassan C, Czuriga D, de Tombe PP, Papp Z, Lacampagne A, Cazorla O Beneficial effects of SR33805 in failing myocardium. CARDIOVASCULAR RESEARCH 91: (3) pp. 412-419. (2011) IF: 6.064
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 1 Függő idéző: 1 Összesen: 2

44. Fedor R, Asztalos L, Locsey L, Szabo L, Manyine IS, Fagyas M, Lizanecz E, **Toth A** Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme predicts left ventricular hypertrophy after renal transplantation. TRANSPLANTATION PROCEEDINGS 43:(4) pp. 1259-1260. (2011) IF: 1.005
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos

45. Szántó M*, Rutkai I*, Hegedűs Cs, Czikora Á, Rózsahegyi M, Kiss B, Virág L, Gergely P,

Tóth A, Bai P Poly(ADP-ribose) polymerase-2 depletion reduces doxorubicin-induced damage through SIRT1 induction CARDIOVASCULAR RESEARCH 92:(3) pp. 430-438. (2011) IF: 6.064

Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos

Független idéző: 3 Függő idéző: 3 Összesen: 6

46. Czikora A, Lizanecz E, Bako P, Rutkai I, Ruzsnavszky F, Magyar J, Porszasz R, Kark T, Facsko A, Papp Z, Edes I, **Toth A** Structure-activity relationships of vanilloid receptor agonists for arteriolar TRPV1. BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY 165:(6) pp. 1801-1812. (2012) IF: 4.409*
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
Független idéző: 1 Összesen: 1
47. Czikora A, Lizanecz E, Boczan J, Darago A, Papp Z, Edes I, **Toth A** Vascular metabolism of anandamide to arachidonic acid affects myogenic constriction in response to intraluminal pressure elevation. LIFE SCIENCES 90:(11-12) pp. 407-415. (2012) IF: 2.527*
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
48. Czuriga D, **Toth A**, Pasztor ET, Balogh A, Bodnar A, Nizsaloczki E, Lionetti V, Recchia FA, Czuriga I, Edes I, Papp Z Cell-to-cell variability in troponin I phosphorylation in a porcine model of pacing-induced heart failure. BASIC RESEARCH IN CARDIOLOGY 107:(2) Paper PMID: 22237651. 13 p. (2012) IF: 7.348*
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
49. Darago A, Fagyas M, Siket IM, Facsko A, Megyesi Z, Kalasz J, Galajda Z, Szerafin T, Harsfalvi J, Edes I, Papp Z, **Toth A**, Szentmiklosi J 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) pp. 136-144. (2012) IF: 2.353*
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
50. Fuerjes G, Toth G K, Peitl B, Porszasz R, Lelesz B, Sari R, **Toth A**, Szilvassy Z, Nemeth J Thritene radioimmunoassay: description and application of a novel method. JOURNAL OF RADIOANALYTICAL AND NUCLEAR CHEMISTRY 292:(1) pp. 113-118. (2012) IF: 1.520*
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
51. Kolozsvari B, Bako E, Becsi B, Kiss A, Czikora A, **Toth A**, Vamosi G, Gergely P, Erdodi F Calcineurin regulates endothelial barrier function by interaction with and dephosphorylation of myosin phosphatase. CARDIOVASCULAR RESEARCH 96:(3) pp. 494-503. (2012) IF: 6.064*
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
52. Sun W, Liu K, Ryu H, Kang DW, Kim YS, Kim MS, Cho Y, Bhondwe RS, Thorat SA, Kim HS, Pearce LV, Pavlyukovets VA, Tran R, Morgan MA, Lazar J, Ryder CB, **Toth A**, Blumberg

dc_652_12

PM, Lee J 2-(4-Methylsulfonylaminophenyl) propanamide TRPV1 antagonists: Structure-activity relationships in the B and C-regions. BIOORGANIC AND MEDICINAL CHEMISTRY 20:(3) pp. 1310-1318. (2012) IF: 2.921*

Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos

Független idéző: 1 Függő idéző: 1 Összesen: 2

7.5. Összefoglaló scientometriai adatok

Közlemény típusok	Szám		Hivatkozások	
	Összesen	Részletezv 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

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

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

dc_652_12

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 faktorai	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

8. 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 mentorként: **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.