Doktori (PhD) értekezés tézisei

Tranziens Receptor Potenciál Melasztatin 3 ioncsatorna farmakológiai vizsgálata és szerepe a szomatoszenzoros érzékelésben

Kelemen Balázs

Témavezető: Dr. Tóth István Balázs

DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvovostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2021

Tranziens Receptor Potenciál Melasztatin 3 ioncsatorna farmakológiai vizsgálata és szerepe a szomatoszenzoros érzékelésben

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Kelemen Balázs
okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudományi doktori iskolája
(Élettan és neurobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Tóth István Balázs

A doktori szigorlati bizottság:
elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, akadémikus
tagok: Dr. Varga Zoltán, PhD
Dr. Sántha Péter, PhD
A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Immunológiai Intézet
2019. szeptember. 03. 11:00
A doktori szigorlat minősítése: Summa cum laude

Az értekezés bírálói:
Dr. Pozsgai Gábor, PhD
Dr. Szűcs Péter, PhD

A bírálóbizottság:
elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, akadémikus
tagok: Dr. Sántha Péter, PhD
Dr. Garami András, PhD

Az értekezés online védésének időpontja:
Debreceni Egyetem ÁOK, Élettani Intézet
202. május 21 13:00

Bevezetés

A fájdalomról és a viszketésről egyaránt elmondható, hogy olyan szenzoros jelenségek melyekhez valamilyen negatív érzést társítunk. Laboratóriumunk, kollaborációs partnereinkkel közösen, évek óta foglalkozik az emberi bőr és különböző szenzoros funkciók, mint pl.: a fájdalom és viszketés, (kór)élettani folyamatainak különböző aspektusaival. Korábbi kísérletes eredményeink számos, a szenzoros funkciókban kimagasló szerepet játszó, Tranziens Receptor Potenciál (TRP) ioncsatorna családba tartozó fehérje működésének és az általuk mediált mechanizmusok jobb megértéséhez járultak hozzá.

A fájdalom és viszketés detektálását a szomatoszenzoros neuronok idegvégződésein kifejeződ receptorok végzik. A fájdalomérzékelésben és annak transzdukciójában szerepet játszó molekuláris résztvevők egy jelentős része a hőérzékeny TRP ioncsatornák csoportjába tartozik. Egyes hőérzékeny TRP csatornákról, úgy, mint a TRPV1 és TRPA1 kimutatták, hogy nem csak a hőmérséklet és a fájdalom, de a viszketés érzékelésében és transzdukciójában is szerepet játszanak. Saját kutatásunk alapjaként a fájdalom kialakulásában már ismerten szerepet játszó, de a korábban említett TRP csatornákhoz képest kevésbé karakterizált hőérzékeny Tranziens Receptor Potenciál Melasztatin 3 (TRPM3) ioncsatorna további funkcionális és farmakológiai vizsgálatát tűztük ki célul. Kutatásaink során teszteltük különböző illékony anesztetikumok hatását a TRPM3 ioncsatornára, illetve tanulmányoztuk a TRPM3 korábban még nem vizsgált szerepét a viszketés kialakulásában. Eredményeink tovább bővítik tudásunkat a csatorna élettani szerepeivel, és farmakológiai tulajdonságaival kapcsolatban, és reményeink szerint hozzájárulhatnak új típusú, TRPM3-at célzó gyógyszerek fejlesztéséhez.

Célkitűzések

Az anesztetikumok hatásának vizsgálatához a rekombináns TRPM3-at overexpresszáló HEK293T sejteken és a natív TRPM3-at expresszáló egér hátsógyöki ganglionokból származó szenzoros neuronokon végeztünk kísérleteket. A TRPM3 kémiai aktivációja során vizsgáltuk a halotán, chlorofom, isoflurán és szevoflurán hatását. Az illékony anesztetikumok TRPM3-ra kifejtett hatásának vizsgálata során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Más hőérzékeny TRP csatornákhoz hasonlóan, az illékony anesztetikumok fejtenek-e ki valamilyen aktiváló, vagy gátló hatást a TRPM3 ioncsatornára?
2. Az anesztetikumok befolyásolják-e valamilyen módon a TRPM3 kémiai agonistákkal vagy hőmérséklet által történő aktivációját?
3. Befolyásolják-e az anesztetikumok a CIM0216 által aktivált, a TRPM3 ioncsatorna alternatív pórusán átfolyó transzmembrán áramokat?
4. A rekombináns TRPM3 ioncsatorna mellett milyen hatást fejtenek ki az illékony anesztetikumok a natív TRPM3-ra?

A TRPM3 ioncsatorna viszketésben betöltött szerepének vizsgálatához in vivo viselkedés teszteket, úgymint a *„cheek”* és *„nape”* modellt alkalmaztunk. Emellett vizsgáltuk a TRPM3 ioncsatorna funkcióját a különböző pruritogén anyagok celluláris hatásaiban farmakológiai módszerekkel, *Trpm3*$^{+/+}$ és *Trpm3*$^{-/-}$ egerek trigeminális ganglionjaiból származó szenzoros neuronok felhasználásával. Kísérleteink során az alábbiakra voltunk kíváncsiak:

1. Más hő és fájdalom érzékelő TRP csatornákhoz hasonlóan van e szerepe a TRPM3 ioncsatornának a viszketés kialakulásában?
2. Az ismert algogén hatású TRPM3 agonisták indukálnak e viszketést?
3. Szerepet játszik-e a TRPM3 az endogén pruritogén mediátorok hatásában trigeminális szenzoros neuronokon?

Anyagok és módszerek

IA-k stabil oldatának készítése és GC/MS ellenőrzése

Az illékony anesztetikumok TRPM3 ioncsatornára gyakorolt hatásainak vizsgálatához a project során használt anesztetikumokból a mérésekhez 10 mM-os törzsoldatokat készítettünk a tiszta anesztetikumokat a mérésekhez használt mérő oldatban (Ca^{2+} puffer vagy patch-clamp extracelluláris oldat) oldva. A tökéletes oldódás érdekében a törzsoldatokat légmentesen zárt üveg lombikban egy éjszakán át kevertettük. A kísérletek során, a megfelelő végkoncentrációjú munka oldatokat minden esetben frissen készítettük a 10 mM-os törzsoldatból, amit 45 percen belül felhasználtunk. A 10 mM-os törzsoldatok stabilitását nyitott, szabadon szellőző edényben GC/MS módszer segítségével a DE-ÁOK Igazságügyi Orvostani Intézetének Toxikológiai Laboratóriumában ellenőrizték. A stabilitás ellenőrzéshez a törzsoldatokat a fent leírt módon készítettük el. A gázkromatográfiás mérés során nyitott edényben tárolták az oldatokat, szimulálva a nyitott perfúziós rendszerben történő kísérletes elrendezésünket. A mérési protokoll során a 0., 10., 20., 30., 45.-percben történt minta vétel. Az anesztetikumok azonosítása Agilent 7980B-5977A GC-MS készülék (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) felhasználásaval történt.

Felhasznált állatok

Az *in vitro* és *in vivo* kísérleteinkhez egyaránt 10-14 hetes egereket használtunk, melyeket konvencionális állatházi körülmények között, 21 °C-on, 12 órás világos-sötét ciklusok váltakozása mellett, korlátlan víz és étel hozzáféréssel tároltunk. A projectjeink során használt primer szenzoros neuronokat *Trpm3*$^{+/+}$ (vad típusú C57Bl6) és C57Bl6 eredetű *Trpm3*$^{-/-}$ egerek trigeminális és hátsógyöki ganglionjaiból (TG és DRG) izoláltuk. Az izoláláshoz vegyesen használtunk hím és nőstény egereket. Az *in vitro* kísérletekhez használt *Trpm3*$^{+/+}$ egereket a Debreceni Egyetem Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet fenntartása alatt

működő Kísérleti állatház, és Prof. Thomas Voets által vezetett Ioncsatorna-kutató Laboratórium (KU Leuven Belgium) által fenntartott állatház biztosította. A TRPM3 viszketésben játszott szerepének vizsgálata során alkalmazott „*cheek model*” viselkedés tesztekhez kizárólag hím *Trpm3*$^{-/-}$ és *Trpm3*$^{+/+}$ állatokat használtunk, melyeket Prof. Thomas Voets által vezetett Ioncsatorna-kutató Laboratórium (KU Leuven Belgium) által fenntartott állatház biztosította. A „*nape model*” során, a *Trpm3*$^{-/-}$ és *Trpm3*$^{+/+}$ egyedekből vegyesen alkalmaztunk hím és nőstény egyedeket, mely állatokat kollaborációs partnerünk, prof. Rohács Tibor által vezetett kutatócsoportban vizsgálták. Az *in vivo* viselkedéses állat kísérleteket, a Leuveni Katolikus Egyetem Laboratóriumi Állatok Etikai Bizottsága (engedélyszám: P021/2018), és a Rutgers New Jersey Medical School Laboratóriumi Állatok Etikai Bizottsága felügyelte.

Sejttenyésztés és primer neuron izolálás

Az *in vitro* kísérleteinket HEK293T és mTRPM3α2 egér izoformát stabilan overexpresszáló HEK293T (HEK-M3) sejtvonalakon, illetve *Trpm3*$^{+/+}$ egérből izolált primer DRG szenzoros neuronokon és *Trpm3*$^{+/+}$ és *Trpm3*$^{-/-}$ egerekből izolált primer TG szenzoros neuronokon végeztük.

HEK293T sejtek

A kontrollként használt „üres” HEK293T és a mTRPM3α2-t stabilan overexpresszáló HEK-M3 sejtvonalakat Prof. Thomas Voets (Ioncsatorna-kutató Laboratórium (KU Leuven, Belgium)) bocsátotta rendelkezésünkre. A HEK-M3 sejtvonalat Flp-In transzfekciós rendszer segítségével hozták létre. A sejtvonalakat 37°C-on 5 % CO_2 tartalom mellett termosztátban tenyésztettük, endotoxin mentes DMEM tápoldatban. A tápoldatot 10% fötális borjúsavóval (FBS), 50 IU/ml Penicillin , 50 µg/ml Streptotmycin, 25 mg/ml L-glutamint és megfelelő mennyiségű 10x koncentrációjú nem esszenciális aminosav oldat hozzáadásával készítettük. A HEK-M3 sejtek médiumát szelekciós antibiotikumként 200 µg/ml Hygromycinnel egészítettük ki. A sejttenyészeteket

70-80%-os konfluencia elérésekor passzáltuk további kísérletekhez 0,25 % tripszin tartalmú oldat felhasználásával. A HEK293T és HEK-M3 sejtvonalakon végzett kísérletek során a sejteket minden esetben poly-l-lysin HBr-al kezelt, az adott kísérlethez kompatibilis mérő edénybe szélesztettük.

TG és DRG neuron izolálás

Az anesztetikumok vizsgálatához a szenzoros neuronokat *Trpm3*$^{+/+}$ egerek hátsógyöki ganglionjaiból, míg a pruritogének vizsgálatához *Trpm3*$^{+/+}$ és *Trpm3*$^{-/-}$ egerek trigeminális ganglionjaiból izoláltuk enzimatikus módon. A neuronok izolálása során hím és nőstény egereket vegyesen használtunk. A DRG neuronok izolálása során az egereket CO_2 gáz felhasználásával terminátuk, míg a TG neuronok izolálása során cervicalis dislocatiot-t alkalmaztunk. Az összegyűjtött DRG- és TG-neuronokat a preparálás során végig jégen tartott, NeuroBasal medium + 10% FBS + antibiotikum (P/S) oldatba gyűjtöttük. Az állatok terminálását követően legkésőbb 30 perccel megkezdtük a neuronok enzimatikus emésztését, 2 mg/ml collagenase és 2,5 mg/ml dispase tartalmú oldatban, lezárt eppendorf csőben, 37°C-os vízfürdőben, 40 percig. Az enzimatikus emésztést követően az enzimes oldatot eltávolítottuk és háromszor átmostuk a sejteket neuron tenyésztő oldat (NeuroBasal + 10% FBS + P/S) segítségével. Ezt követően a ganglionokat csökkenő átmérőjű orvosi fecskendőtűk (18G-> 20G-> 22G-> 26G) használatával egyedi sejtekre szuszpendáltuk . A DRG neuronokat a sejtizolálást követően poly-L-lysine HBr kezelt üvegaljú Petri-csészére szélesztettük és 10% FBS, 2% B-27-el, 2 mM L-glutaminnal , 100ug/ml P/S-el és 100 ng/ml B-NGF-el kiegészített NeuroBasal médiumban tenyésztettük 37°C 5% CO_2 jelenlétében. A TG neuronokat a sejtizolálást követően poly-L-ornitin és laminin kezelt üvegaljú Petri-csészére szélesztettük és 10% FBS, 2% B-27-el, 2mM L-glutaminnal, 100ug/ml P/S-el, 2 ng/ml GDNF-el és 10 ng/ml NT4-el kiegészített NeuroBasal médiumban tenyésztettük 37°C-on 5% CO_2 jelenlétében. Az izolált szenzoros neuron tenyészeteket az izolálás után 24-36 órán belül felhasználtunk kísérlethez.

Intracelluláris Ca^{2+}-szint mérés

A projektjeinkhez használt különböző intracelluláris Ca^{2+} mérések kísérletes elrendezése a felhasznált mérőrendszerek és a kísérletes protokollok tekintetében ugyan különböztek, azonban a mérések alapelve minden esetben hasonló. Az intracelluláris Ca^{2+} szint változás méréséhez fluoreszcens Ca^{2+} érzékeny Fluo-4-AM vagy Fura-2-AM festékeket alkalmaztunk. A Fluo-4-nek szabad Ca^{2+} jelenlétében jelentősen megnő a fluoreszcencia intenzitása, amit a mérés során detektálhatunk (excitáció: 490 nm; emisszió: 520 nm). A Fura-2 festék esetében a Ca^{2+}-ot kötő festékmolekula gerjesztési maximuma eltolódik: a Ca^{2+}-ot kötő forma excitációs maximuma 340 nm, a nem kötött molekuláé 380 nm, míg az emissziója mind a két esetben 510 nm. A HEK293T és HEK-M3 sejtek intracelluláris Ca^{2+} szintjének változásainak mérését többsejtes elrendezésben végeztük, mely során a sejteket vagy 96 lyukú lemezekre szélesztettük és a mérést Flex Station III automata mikrolemez-olvasó használatával végeztük. A hőstimulációs mérésekhez tripszines emésztést követően a sejteket PCR csövekbe gyűjtöttük össze és hőmérséklet változtatásához és az egyidejű fluoreszcens mérésekhez Q-PCR gépet használtunk. A primer DRG és TG neuronokon történt intracelluláris Ca^{2+} méréseket egyedi sejtes elrendezésben végeztük, nyitott rendszerű gravitációs perfúzió használatával, Zeiss LSM 5 Live fluorescens konfokokális mikroszkóppal.

Patch Clamp mérések

Az anesztetikumok TRPM3 ionáramaira gyakorolt hatásainak vizsgálatát teljes sejtes (whole-cell) elrendezésű patch-clamp kísérletek során végeztük el, Axopatch 1.D erősítő és Clampex 10.2 szoftver (Molecular Devices) segítségével. A HEK-M3 sejteket poly-l-lysin HBr-al kezelt 12 mm átmérőjű üveg fedőlemezekre passzáltuk, majd a sejtkirakás után 2-3 órával letapadt sejteken végeztük el a méréseket. A kísérlet során a külső, extracelluláris oldat 150 mM

NaCl-ot, 1 mM $MgCl_2$-ot, és 10 mM HEPES puffert tartalmazott, pH-ját 7.4-re állítottuk be NaOH-dal. A pippetákban lévő belső, intracelluláris oldat 100 mM aszpartátot, 45 mM CsCl-ot, 1.144 mM $MgCl_2$-ot, 10 mM HEPES-t, és 10 mM EGTA-t. A pH-ját CsOH-al 7.2-re állítottuk be, ami megközelítőleg 100 mM Cs-aszpartát végkoncentrációt eredményezett a pipettaoldatban. A mikropipettákat egy programozható elektróda-húzó segítségével, boroszilikát üveg kapillárisból készítettük, melyeknek mért ellenállása (pipetta ellenállás) 2–5 MΩ tartományban mozgott. A teljes sejtes konfiguráció létrehozása után, a sejtek kapacitása jellemzően 10 pF körüli értéket mutatott, míg a soros ellenállás 10 MΩ alatt volt, melyet 50-70 %-ban kompenzáltunk. A mérési protokollunk során feszültség zár technikát alkalmaztunk, mely során 0 mV tartópotenciál mellett 2 másodpercenként 200 ms hosszú, -150 mV-tól + 150 mV-ig terjedő depolarizációs rámpa alatt mértük a teljes sejtmembránon átfolyó ionáramokat.

Egér viselkedés tesztek

Különböző pruritogének és algogének hatását *Trpm3*$^{+/+}$ és Trpm3 génkiütött, *Trpm3*$^{-/-}$ C57/Bl6 egereken vizsgáltuk *in vivo*, az ún. *„nape”* modell és a *„cheek”* modell alkalmazásával, melyek közül az utóbbi lehetővé teszi a fájdalmas és a viszketéses viselkedéses válaszok elkülönítését és kvantitatív jellemzését is. LaMotte és munkatársai eredeti protokolljában használt intradermális injekciókhoz képest, mind a *„cheek”* modell mind pedig a *„nape”* modell során szubkután injekciókat alkalmaztunk, azonban, a két különböző viselkedésteszthez használt protokoll, a beinjektált terület kivételével megegyeznek. A tesztekhez 8-14 hetes korú hím *Trpm3*$^{+/+}$ és *Trpm3*$^{-/-}$ egyedeket használtunk. Az állatokat a kísérletet megelőző 7. napon, naponta egyszer elkezdtük adaptálni a kísérletes körülményekhez. A kísérlet előtti 1. napon a *„nape”* modellhez leborotváltuk a szőrt az állatok tarkójáról, míg a *„cheek”* modell során, az állatok pofájáról. Az *in vivo* viselkedés tesztek során, az egereket az injektálás előtt 10 percig adaptáltuk a kísérletes körülményekhez és rögzítettük a spontán viselkedést

videokamera segítségével. A *„cheek”* modell során az alkalmazott anyagokat szubkután injektáltuk az egerek előzetesen leborotvált megfelelő oldali pofájába, míg a *„nape”* modell alkalmazása esetében, a tarkójába, majd az injekciót követően az egereket rögtön visszahelyeztük a megfigyelő kamrába, és ezt követően a pruritogén anyagokra adott viselkedéses válaszokat 30 percig rögzítettük videó kamera segítségével. A felvételek elemzése során a vakarózási események számát két független megfigyelő határozta meg. Az elemzés során, egy vakaródzási eseménynek tekintjük azt a teljes eseménysort, amikor az állat, valamelyik hátsó lábát felemelve, a mancsával a beinjektált területet vakarja majd végül vagy visszahelyezi a talajra vagy a szájához emeli és nyalogatja azt. A *„cheek”* modell során vakarózással töltött teljes időhossz, illetve a vakaródzási és fájdalmas válaszesemények számát is kvantifikáltuk. Egy fájdalmas eseménynek tekintünk egy olyan egyedi mozdulatot mely során az állat, kizárólag az azonos oldali első mancsát emelve, a beinjektált területet megérinti, dörzsöli. A módszerek során használt kezelőanyagok 7% TWEEN-80 tartalmú Ca^{2+} és Mg^{2+} mentes foszfát pufferelt só oldatban (PBS) oldottunk be és a következő koncentrációban alkalmaztuk: 200 µg/50 µl hisztamin, 30 µg/50 µl szerotonin és 250 ng/50 µl endothelin-1 a nape modell esetében, míg 10 µg/10 µl PregS, 10 µg/10 µl Capsaicin, 5 µg/10 µl CIM0216, 50 µg/10 µl Histamine, 10 µg/10 µl Serotonin, 150 ng/ 10 µl Endothelin-1 a *„cheek”* modell alkalmazása esetén. A szubkután mikroinjekciókat 1 ml-es inzulin fecskendőhöz rögzített 30G-s orvosi fecskendőtűvel végeztük el.

Statisztika

A kísérletes adatok feldolgozását OriginPro 9.0 szoftverrel (OriginLab Corporation, Borthampton, MA, Egyesült Államok) végeztük. Eredményeinket átlag ± SD formában prezentáltuk. A dózis-hatás összefüggések vizsgálatához logisztikus dózishatás görbéket illesztettünk az alábbi egyenlet szerint: y= A2 + (A1- A2)/(1 + (x/x0)^p), ahol A1: a minimális válasz értéke (y_{min}), A2: a

maximális válaszértéke (y_{max}), x0: a félhatásos koncentráció (EC50/IC50), p: a meredekséget meghatározó számított kitevő. Az y tengelyen a Ca^{2+} jelek amplitúdóját, míg az x tengelyen az alkalmazott anyag koncentrációjának 10-es alapú logaritmusát ábrázoltuk.

A statisztikai analíziseket részben IBM SPSS Statistic 23.0 (IBM, Armonk, NY, USA), részben OriginPro 9.0 (OriginLab Corporation) szoftver segítségével végeztük. Az izozakuranetin antagonista hatásának tesztelésekor az agonista indukált Ca^{2+} szignálokat izozakuranetin jelenlétében és hiányában Student-féle kétoldalú t-próbával hasonlítottuk össze. A különböző HEK-M3 sejtek között mért áramok nem kívánt variációinak kiküszöbölésére az agonista által indukált áramokat 100%-nak tekintve, a VA-k jelenlétében mért TRPM3-áramokat normalizáltuk ugyanabban a sejtben, és a különböző sejtekben mért adatokat Student-féle kétoldalú t-teszttel hasonlítottuk össze. Az szenzoros neuronokon rögzített Ca^{2+} jelek esetén - hacsak másképpen nem említjük - a jel amplitúdóját normalizáltuk az 1. agonista által kiváltott jelre, amelyet 100% -nak tekintünk. Ezután az adatokat statisztikai elemzésnek vettük alá egyszempontos ANOVA és Dunnett post-hoc teszt alkalmazásával, hogy összehasonlítsák a VA-k hatását a kontrol esetben tapasztaltakkal. Minden esetben $P<0,05$ értéket tekintettük szignifikáns különbségnek a csoportátlagok között. *In vivo* viselkedéses kísérleteink során a statisztikai összehasonlításhoz Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk. Itt is minden esetben $P <0,05$ értéket tekintettük szignifikáns különbségnek a csoport átlagok között. Az *in vivo* és *in vitro* kísérleteinkhez tartozó adatok átlag ± SD formájában vannak megadva.

Eredmények

Illékony anesztetikumok hatása a TRPM3 ioncsatorna működésére

Az illékony anesztetikumok stabilitásának vizsgálata

Kísérleteink során különböző kémiai szerkezetű illékony anesztetikumok (IA-k) TRPM3 ioncsatornára kifejtett hatásait vizsgáltuk. Figyelembe véve az anesztetikumok illékony és lipofil tulajdonságait, az *in vitro* kísérletekhez szükséges vizes alapú stabil oldatok elkészítése kihívást jelentett. Korábbi kutatások azonban kimutatták, hogy 25°C-on, 10 mM vagy az alatti koncentrációban stabil oldat készíthető belőlük. Az általunk készített 10 mM koncentrációjú törzsoldatok stabilitását, gázkromatográfiás (GC/MS) mérésekkel vizsgáltuk meg, nyitott, szabadon levegőző rendszerben, ezzel imitálva a szabadlevegőn, illetve perfúziós rendszerekkel végzett kísérletes elrendezéseinket. A GC/MS méréseket dr. Posta János, a DE-ÁOK Igazságügyi Orvostani Intézetének Toxikológiai Laboratóriumában végezte el. A kísérlethez a 10 mM-os törzsoldatokat a módszerek fejezetben bemutatott módon egy nappal a mérések előtt készítettük el. Kísérletes eredményeink azt mutatták, hogy az anesztetikumok 10 mM-os törzsoldatainak a koncentrációja nyitott edényben, 45 perces időtartamon belül szignifikánsan nem változik.

IA-k hatása a rekombináns TRPM3 kémiai aktivációjára

Elsőként intracelluláris Ca^{2+} mérések során IA-k jelenlétében vizsgáltuk a rekombináns TRPM3 kémiai aktivációját HEK-M3 sejteken. Kísérleteink során különböző koncentrációjú IA-kal való kezelés után aktiváltuk a TRPM3-at, az endogén agonista PregS vagy az exogén agonista CIM0216 felhasználásával az anesztetikumok jelenlétében. Eredményeink egyértelműen bizonyították, hogy az általunk használt anesztetikumok nem aktiválják a rekombináns TRPM3 ioncsatornát, azonban dózis függő módon gátolják az endogén PregS és a potensebb, exogén aktivátor CIM0216 által kiváltott TRPM3 aktivációt.

Eredményeink szerint az 1mM-ban alkalmazott IA-k, a 0,1 és 300 μM-os koncentráció tartományban alkalmazott PregS TRPM3-ra ható dózishatásgörbéjét és EC_{50} értékét magasabb koncentráció tartományok felé tolják el. Habár kísérleteink során a vizsgált anesztetikumok közül a halotán bizonyult a legpotensebb TRPM3 inhibitornak, 5 mM koncentrációban alkalmazva azonban önmagában is intracelluláris Ca^{2+} emelkedést váltott ki. Ez a hatás, kísérletes eredményeink alapján TRPM3 függetlennek tekinthető, miszerint (i) az 5 mM halotán által okozott Ca^{2+} tranziensek egyaránt megfigyelhetőek HEK293T és HEK-M3 sejteken is, illetve (ii) a halotán által indukált Ca^{2+} tranziensek a TRPM3 antagonista izozakuranetin nem gátolta.

IA-k hatása a TRPM3 által mediált transzmembrán áramokra

A továbbiakban megvizsgáltuk az anesztikumok hatását a TRPM3 által mediált transzmembrán áramokra is, teljes sejtes (whole cell) konfigurációjóban alkalmazott patch-clamp módszer segítségével. Kísérleteink során, a PregS által aktivált kifelé rektifikáló áramokat, az anesztetikumok 1 mM koncentrációban részlegesen, míg 5mM koncentrációban alkalmazva teljes mértékben gátolták, mely hatások gyorsnak és kimoshatónak bizonyultak**.** Hasonlóan a korábbi IC Ca^{2+} méréses kísérleteinkhez, a patch clamp kísérleteink során is a szevoflurán bizonyult a legkevésbé erős gátlószernek, 1 mM koncentrációban csak nagyon kevéssel gátolta a PregS aktivált TRPM3 áramokat, azonban 5 mM koncentrációban alkalmazva emelkedett, de nem teljes gátlást figyelhettünk meg. A PregS által indukált transzmembrán áramok a TRPM3 fő pórusán keresztül folynak, míg a potensebb exogén aktivátor CIM0216, a fő pórus mellett, egy, a TRPM3 feszültség szenzor doménjában található alternatív permeabilitási útvonalat is megnyit, melyen negatív membrán potenciál mellett befelé irányuló áram folyik. Kísérletes eredményeink bizonyítják, hogy az általunk vizsgált IA-k, hasonlóan a PregS általi aktiváció során tapasztalt hatásokhoz, 1 mM-ban alkalmazva részlegesen, míg 5mM-ban erőteljesen gátolják a CIM0216 által

aktivált fő póruson, és az alternatív permeabilitási útvonalon keresztül futó áramokat is**.**

IA-k hatása egér hátságyöki ganglionokból izolált szenzoros neuronokon kifejeződő natív TRPM3 ioncsatornákra

A project folytatásaként egér hátságyöki ganglionokból izolált szenzoros neuronokon vizsgáltuk az IA-k natív TRPM3 ioncsatornára kifejtett hatásait. A neuronokon végzett IC Ca^{2+} mérésekhez használt kísérletes protokoll során háromszor ismételt 2 percig tartó PregS stimulációt alkalmaztunk, illetve a 2. alkalmazás előtt, 2 perc hosszan és további 2 perc hosszan a 2. PregS alkalmazás alatt, 1 mM koncenctrációjú, az adott kísérlethez használt anesztetikummal kezeltük a sejteket. Eredményeink analízise során, a kísérletes protokoll végén alkalmazott 25 mM KCl oldatra depolarizálódó sejteket neuronoknak, illetve a PregS-re (PregS+) válaszoló neuronokat pedig TRPM3-at expresszáló (TRPM3+) neuronoknak tekintettük. Korábbi kutatásokhoz hasonlóan, saját eredményeink is bizonyítják, hogy az illékony anesztetikumok direkt módon aktiválnak egyes szenzoros neuronokat az alábbi eloszlásnak megfelelően: 15.3%, 21%, 5.1% és 1,8%-a a neuronoknak aktiválódik 1mM halotán, kloroform, izoflurán és szevoflurán kezelés hatására**.** Az IA-k által aktivált neuronok aránya a TRPM3+ és TRPM3- neuronokban közel azonosnak adódott, illetve a TRPM3+ neuronok döntő többsége nem aktiválódott az IA kezelés hatására (IA- neuronok)**.** Ez az eredmény egyértelműen megerősíti azt a feltételezésünket, miszerint a neuronok IA-k általi aktivációja független a TRPM3 ioncsatornától. Hogy kizárjuk az IA-k által indukált TRPM3 független Ca^{2+} tranziensek hatását a PregS indukált válaszokra, az analízisünk során kizárólag a TRPM3+ de IA- neuronokat vizsgáltuk. Eredményeink bizonyítják, hogy az általunk vizsgált IA-k 1 mM koncentrációban alkalmazva hatásosan gátolják a PregS által kiváltott TRPM3 által mediált Ca^{2+} válaszokat. Az anesztetikumok által keltett gátló hatás 4 perccel az applikáció után kimoshatónak tekinthető.

A TRPM3 ioncsatorna viszketésben betöltött szerepének vizsgálata

A TRPM3 viszketésben és fájdalom érzékelésben betöltött szerepének vizsgálata érdekében *Trpm3*$^{+/+}$ és *Trpm3*$^{-/-}$ egereken végeztünk *in vivo* viselkedés vizsgálatokat és ezen egerekből izolált szenzoros neuronok pedig *in vitro* kísérleteket. Az alábbi projekthez tartozó *in vitro* intracelluláris Ca^{2+} mérések egy részét a Debreceni Egyetemen, míg másik részét, illetve a *„cheek"* modell alkalmazásával végzett egér viselkedés teszteket Belgiumban, a Leuveni Katolikus Egyetemen kollaborációs partnerünk, Thomas Voets, által vezetett Ioncsatorna-kutató Laboratóriumban végeztem. Eredményeinkben bemutatott „*nape"* modellhez tartozó kísérleteket kollaborációs partnerünknél, a Rohács Tibor által vezette kutató laboratóriumban (Rutgers New Jersey Medical School, Newark, NJ, USA), Nawoo Kim PhD hallgató végezte el.

PregS a TRPM3-on keresztül fájdalmat indukál, de viszketést nem

Az általunk használt protokoll alapjául LaMotte és munkatársai (2008) által, korábban bemutatott módszert vettük alapul. Az apróbb módosításokkal véglegesített protokollt a módszerek fejezetben mutattam be részletesen. A *„cheek"* modell protokolljának beállítását követően, különböző algogén és pruritogén anyagok vizsgálatát kezdtük el a *Trpm3*$^{+/+}$ illetve a TRPM3 ioncsatornára nézve hiányos *Trpm3*$^{-/-}$ egereken. Korábbi kutatások már bemutatták, hogy mind az endogén TRPM3 aktivátor PregS és mind az exogén agonista CIM0216 fájdalomhoz köthető viselkedéses válaszokat indukálnak különböző egér modellekben. Így elsőként, megvizsgáltuk a PregS és a CIM0216 hatását, a kontrolként használt, ismert algogén hatású kapszaicinhez illetve a negatív kontrolként használt vivőanyaghoz (PBS+ 7% TWEEN-80) hasonlítva. A *„cheek"* modell alkalmazása során a kapszaicin mind a két egértörzsben fájdalomhoz köthető viselkedéses válaszokat váltott ki, de nem váltott ki viszketéshez köthető válaszokat egyik csoportban sem. A kontrollként használt

vivőanyag, se fájdalomhoz, sem pedig viszketéshez köthető válaszokat nem indukált egyik típusú állatban sem. Kísérletes eredményeink bizonyítják, hogy sem az endogén, sem pedig az exogén TRPM3 agonista nem okozott viszketéshez köthető viselkedéses válaszokat egyik típusú állatban sem, ellenben a PregS és CIM0216 kezelés során egyaránt fájdalomhoz köthető válaszokat tapasztaltunk a *Trpm3*$^{+/+}$ egerekben, mely viselkedéses válaszok a *Trpm3*$^{-/-}$ állatokban elmaradtak.

Az, hogy *„cheek"* modell során a fájdalmas és viszketéses válaszok elkülöníthetőek egymástól, lehetővé tette számunkra egy új, az irodalomban eddig még nem használt paraméter, az ún. *„viszketés ráció"* ($R_{viszketés}$) bevezetését, mely segítségével megadható a vizsgált anyagok specificitása a fájdalom-viszketés tengelyén. Számítása során a teljes viszketéses válaszok számát osztjuk a teljes viselkedéses válaszok számával (fájdalmas és viszketéses válaszok összege). Az alacsony (0 vagy ahhoz közeli) $R_{viszketés}$ érték jelenti a tisztán fájdalomra adott viselkedéses válaszokat, míg a magas (1 vagy ahhoz közeli) $R_{viszketés}$ értékek a tisztán viszketéshez köthető, de nem fájdalom által kiváltott viselkedéses válaszokat. Eredményeink azt bizonyítják, hogy a TRPM3 agonista PregS és CIM0216, a TRPV1 agonista kapszaicinnel együtt, a *Trpm3*$^{+/+}$ állatokban algogén, az-az fájdalomkeltő hatású anyagként viselkedtek, magas $R_{viszketés}$ értéket tapasztaltunk. Mindazonáltal, *Trpm3*$^{-/-}$ állatokban, a kapszaicinnel ellentétben, a PregS és CIM0216, a vivőanyag kontrollhoz hasonló általános eloszlást mutattak, mely során az $R_{viszketés}$ értékük, 0.5 körülinek adódott.

Pruritogén anyagok hatása TRPM3 KO állatokban

Fentebb bemutatott eredményeink egyértelműen bizonyítják, hogy a TRPV1 ioncsatornához hasonlóan, a TRPM3 közvetlen kémiai aktivációja, fájdalomhoz köthető viselkedéses válaszreakciók megjelenését okozza, és nem okoz viszketést, azonban ezen eredmények nem zárják ki azt a feltételezést, hogy a TRPM3-nak a TRPV1-hez és TRPA1-hez hasonlóan, szerepe lehet a viszketéshez

köthető szenzoros folyamatok kialakulásában. Korábbi kutatások kimutatták, hogy a TRPV1 közvetlen aktivációja fájdalmat okoz és nem viszketést, azonban pruriceptív szenzoros neuronokon expresszálódó TRPV1 szerepet játszik a hisztamin függő és bizonyos hisztamin független pruriceptív folyamatok továbbításában. A továbbiakban, hogy megvizsgáljuk a TRPM3 ioncsatorna pruritogének indukálta viszketésben betöltött potenciális szerepét, *Trpm3*$^{+/+}$ és *Trpm3*$^{-/-}$ állatokon teszteltük a hisztamin és további nem hisztaminerg pruritogének (szerotonin (5-HT), endothelin-1 (ET-1)) hatását. Ezen anyagok mindegyikéről ismert, hogy viszketést indukálnak, mind emberben mind pedig egér modellekben.

A *„cheek”* modellt alkalmazó kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a hisztamin, 5-HT és ET-1 a *Trpm3*$^{+/+}$ és *Trpm3*$^{-/-}$ állatokban egyaránt viszketést váltott ki, míg fájdalmat nem indukáltak. A pruritogén anyagok kezelése során megfigyelt fájdalomhoz köthető viselkedéses válaszok száma megegyezik a negatív kontrolként használt vivőanyag során tapasztalt fájdalomhoz köthető viselkedéses válaszok számával, míg a vakaródzási események száma, és az állatok vakaródzással töltött ideje, mind három vizsgált pruritogén anyag esetében mind két genotípusú állat esetében megemelkedett. A hisztamin és az 5-HT esetében a *Trpm3*$^{+/+}$ és *Trpm3*$^{-/-}$ állatoknál a pruritogének által indukált vakaródzási válaszreakciók számában nem tapasztaltunk különbséget, azonban érdekes módon az ET-1 által indukált viszketés a *Trpm3*$^{-/-}$ állatok esetében szignifikánsan magasabbnak bizonyult, mint a *Trpm3*$^{+/+}$ állatok esetében. Az $R_{viszketés}$ értékek mind a 3 pruritogén anyag esetében a skála tetején helyezkednek el mindkét típusú állatban, bizonyítva az anyagok pruritogén specifitását.

A fent bemutatott, *„cheek”* modell alkalmazása során kapott kísérletes eredmények egyértelműen bizonyítják a pruritogén anyagok hatását a trigeminális ganglionok (TG) által beidegzett területen nem a TRPM3 mediálja. Következő lépésként megvizsgáltuk a hisztamin, 5-HT, és ET-1 hatását a hátsó gyöki ganglionok által beidegzett területen is. Ehhez az egér *„nape”* modellt

alkalmaztuk, mely során a vizsgálni kívánt anyagokat az egerek tarkójába injektáljuk. Ez a modell ugyan a viszketéses és fájdalmas viselkedéses válaszreakciók megkülönböztetésére nem alkalmas (mivel mindkettő során megegyező vakaródzó válaszreakció tapasztalható), de a pruritogének által kiváltott válaszreakciók, az általunk tapasztalt magas $R_{viszketés}$ értékek és a korábbi kutatások irodalmi adatai tekintetében viszketéshez köthető válaszoknak tekinthetőek. Eredményeink szerint a hisztamin és az 5-HT hasonló intenzitású viszketést váltott ki a *Trpm3*$^{+/+}$ és *Trpm3*$^{-/-}$ egyedekben egyaránt, hasonlóan a *„cheek”* modell alkalmazása során tapasztaltakhoz. Az ET-1 által kiváltott viszketéshez köthető viselkedéses válaszreakciók a *„cheek”* modell során tapasztalt viszketéses válaszokhoz hasonlóan a *„nape”* modell alkalmazása esetén is szignifikánsan magasabbnak bizonyultak a *Trpm3*$^{-/-}$ egyedekben, mint a *Trpm3*$^{+/+}$ állatokban.

Trigeminális szenzoros neuronok pruritogének általi aktivációja független a TRPM3-tól

Hogy megvizsgáljuk a TRPM3 ioncsatorna szerepét a pruritogének által indukált celluláris válaszokban, illetve, hogy validáljuk az *in vivo* viselkedéses eredményeinket, a továbbiakban *in vitro* IC Ca^{2+} méréseket végeztünk *Trpm3*$^{+/+}$és *Trpm3*$^{-/-}$ egerek TG-jaiból izolált szenzoros neuronokon, kétféle kísérletes elrendezésben. Elsőként összehasonlítottuk a pruritogén kezelések során válaszoló szenzoros neuronok arányát *Trpm3*$^{+/+}$ és *Trpm3*$^{-/-}$ egerekből izolált TG neuron kultúrákban. Ezen IC Ca^{2+} méréseink során a szenzoros TG neuronokat hisztaminnal, 5-HT-nal és ET-1-gyel minden esetben külön kísérletek során kezeltük, míg a kontrollként használt TRPM3 agonista PregS-ot, TRPV1 agonista kapszaicint és a TRPA1 agonista fahéj aldehidet (CA-t) minden egyedi kísérletben alkalmaztuk. Kísérleteink során csak azokat a sejteket tekintettük szenzoros neuronoknak és vettük bele a későbbi elemzésünkbe, melyek reagáltak a kísérletek végén alkalmazott depolarizáló hatású KCl oldatra, vagy a

kapszaicinre. A kapszaicinre és a fahéj aldehidre válaszoló neuronok aránya megegyezett a TRPM3 ioncsatorna jelenlétében és/vagy hiányában egyaránt. A *Trpm3*$^{+/+}$ állatok PregS+ és PregS- neuronjainak egy kisebb csoportja egyaránt aktiválódott az általunk alkalmazott pruritogének hatására, mely eredmény azt sugallja, hogy ezen pruritogének hatása független a TRPM3 ioncsatornától. Ezen eredményt alátámasztva, eredményeink egyértelműen mutatják, hogy a *Trpm3*$^{+/+}$ és a *Trpm3*$^{-/-}$ állatokból izolált szenzoros TG neuronok a hisztaminra (10.7 vs. 9.9%; X^2=0.115, p=0.735), szerotoninra (21.6 vs. 17.0%; X^2=1.489, p=0.222) és endothelin-1-re (33.2 vs. 34.3%; X^2=0.006, p=0.939) hasonló arányban válaszoltak.

A TRPM3 farmakológiai gátlása nincs hatással a pruritogének által kiváltott neurális válaszokra

Végezetül megvizsgáltuk a *Trpm3*$^{+/+}$ egerek trigeminális ganglionjaiból izolált szenzoros neuronokon a TRPM3 kémiai gátlásának hatását a pruritogének által indukált celluláris válaszokra. Kísérleteink során a TRPM3 agonista PregS-t, a hisztamint, 5-HT-t és ET-1-et alkalmaztuk, a flavovon származék TRPM3 antagoniosta izozakuranetin jelenlétében és hiányában. A PregS által a TG neuronokban indukált Ca^{2+} tranzienseket az izozakuranetin nagy hatásfokkal és reverzibilis módon gátolja, mely eredmény összhangban van a korábbi kutatások eredményeivel, melyek hátsó gyöki ganglionokból származó neuronokon mutatták ki az izozakuranetin TRPM3 ioncsatorna aktivitását gátló hatást. A project során már kimutattuk, hogy a TRPM3 genetikai hiánya vagy jelenléte nem befolyásolja a pruritogének hatását, és ezen eredményekkel összhangban a *Trpm3*$^{+/+}$ egerek TG neuronjaiból izolált szenzoros neuronokon a TRPM3 kémiai gátlása sem volt hatással a pruritogének által kiváltott neurális aktivációra. Sem a különböző pruritogének által kiváltott Ca^{2+} tranziensek amplitúdója, sem pedig a Hist+, 5-HT+ és ET-1+ neuronok aránya nem változott szignifikánsan 3μM izozakuranetin jelenlétében vagy hiányában, vagyis a pruritogének celluláris hatása is független a TRPM3-tól.

Diszkusszió

A nemrégiben karakterizált TRPM3 ioncsatorna a TRPV1-hez hasonlóan jelentős mértékben expresszálódik a hátsó gyöki ganglionokon és hasonló szerepet játszik a fájdalmas meleg hőmérséklet érzékelésében, illetve a gyulladás esetén fellépő termális hyperalgesia kialakulásában is. Számos kutatás bizonyította, hogy a hőérzékeny TRP csatornák kiemelkedő szerepet játszanak a hőmérsékleti ingerek érzékelésében és sokoldalú aktivációjuk által központi szerepet töltenek be a fájdalom, illetve a viszketés érzékelésben is. Ezen tulajdonságoknak köszönhetően kiemelkedően vonzó farmakoterápiás célpontok lehetnek új típusú fájdalomcsillapító, illetve viszketés terápiában alkalmazható gyógyszerek fejlesztése során. Az elmúlt évtizedben számos gyógyszergyár indított kutatásokat e cél elérése érdekében, elsősorban a TRPV1 ioncsatornát megcélozva. Mindazonáltal általánosan használható TRPV1-et célzó fájdalomcsillapítókat, az intenzív kutatások ellenére, még nem sikerült forgalomba állítani. A TRPV1 gátlószerei, illetve a TRPV1 aktivátorai egyaránt fájdalomcsillapító hatásúak lehetnek, az utóbbiak azáltál, hogy a csatorna aktivációja után a TRPV1 deszenzitizációját okozzák. Azonban a TRPV1 agonisták és antagonisták alkalmazása következtében számos, nehezen tolerálható mellékhatás alakul ki, pl. az alkalmazás helyén jelentkező égő, fájdalmas érzés valamint a testhőmérséklet emelkedése, vagy a forró hőmérséklet iránti relatív érzéketlenség, ami a fájdalmasan meleg ingerek által kiváltott szövetkárosodást és a forrázásos balesetek kockázatát növeli meg. Mivel, ez a stratégia nem tökéletes, az alapkutatási adatok alapján felvetődik más, a nocicepcióban is szerepet játszó, hőérzékeny TRP csatornák terápiás kihasználásának a lehetősége is. Ilyen lehetséges célpont az általunk is vizsgált TRPM3, melynek ismert a fájdalom kialakulásában és a hőmérséklet érzékelésben betöltött szerepe. Korábbi kutatások igazolták, hogy szemben a TRPV1-gyel, a TRPM3 aktivációja illetve gátlása nem befolyásolja a testhőmérsékletet, és antagonistái, úgy mint a flavonok közé tartozó isosakuranetin, hespertin és

liquirigenin gátolják a TRPM3 működését, ezáltal hatékonyan csökkentették a TRPM3 aktivációjához kapcsolódó fájdalom kialakulását.

További, a fájdalom mellett a viszketés kialakulását vizsgáló kutatások bizonyítják, hogy számos már bizonyítottan nociceptív ioncsatorna, szerepet játszik a viszketés kialakulásában és transzdukciójában. Ilyen ioncsatornák a fájdalom és hőérzékeny TRPV1,-3,-4 és TRPA1. A TRPM3 ioncsatorna viszketésben betöltött szerepét azonban korábban még nem vizsgálták.

Anesztetikumok hatása a TRPM3 ioncsatornára

Különböző illékony anesztetikumok befolyásolják a feszültség vezérelt ioncsatorna család számos tagjának aktivációját. Ezen csatornák egy részéről már bebizonyosodott korábban, hogy szerepet játszanak az illékony anesztetikumokkal történő altatás kialakulásában. Ilyen ioncsatornák, például a hiperpolarizációra aktiválódó és ciklikus nukleotid által kapuzott csatorna 1 (HCN1), a feszültség függő K^+ csatornák (K_v1), és 2 pórus doménnel rendelkező K^+ csatornák (K_2P). Emellett különböző IA-k hatásosan gátolják a feszültség vezérelt Na^+ és Ca^{2+} csatornák aktivációját is. Mindemellett korábbi kutatások rámutattak, hogy különböző illékony anesztetikumok befolyásolják bizonyos hőérzékeny TRP csatornák működését is. Ezen kutatási eredmények meggyőző magyarázatot adhatnak számos, az altatás során a használt anesztetikumok által okozott kellemetlen mellékhatások megjelenésére. Az anesztetikumok, egy gyors aktivációt követően hatékonyan gátolják a hideg és mentol aktivált TRPM8-at, mely így, az anesztézia során ritkán előforduló hipotermia kialakulásában játszhat szerepet. Ehhez hasonlóan a halotán és kloroform gátolja a szintén hideg érzékeny TRPC5 aktivációját. A halotán és a kloroform nincs hatással a meleg érzékeny TRPM2-re, viszont a fájdalmas meleg érzékeny TRPV1-et az IÁ-k szenzitizálják, vagy, elég magas koncentrációban alkalmazva, akár aktiválják is. Különböző irritáló mellékhatású anesztetikumok, mint pl. az izoflurán és a desflurán közvetlen módon aktiválják a TRPA1-et, melynek az irritáló hatású kémiai

anyagokra való érzékenysége közismert. A TRPA1 aktivációján keresztül ezen irritáló hatású anesztetikumok bronchoconstrictiot, valamint más fájdalmas válaszreakciókat válthatnak ki és fokozhatják a neurogén gyulladás intenzitását. A csatorna aktivációja szerepet játszhat ezen anesztetikumok kellemetlen mellékhatásainak kialakulásában, mint a légúti irritáció. Mindazonáltal a nem irritáló hatású anesztetikumok nincsenek hatással a TRPA1 ioncsatorna működésére. Saját kutatásunkban célul tűztük ki az illékony anesztetikumok TRPM3 ioncsatornára gyakorolt hatásának vizsgálatát, mely ioncsatorna a TRPV1 és TRPA1 csatornákkal közösen fontos szerepet játszik az akut, magas hőmérséklet által indukált fájdalom kialakulásában.

Az általunk használt illékony aneszetikumok, a hőérzékeny TRPV1-gyel és TRPA1-gyel szemben, nem aktiválták és nem is szenzitizálták a TRPM3-at. Eredményeink szerint a kloroform, a halotán, az izoflurán és a szevoflurán egyaránt gátolta a rekombináns TRPM3 ioncsatorna kémiai ligand, és hőmérséklet által kiváltott aktivációját is. A használt anesztetikumok közül, a halotán bizonyult a legpotensebbnek, a PregS által kiváltott TRPM3 aktivációt ~0,5 mM IC_{50} értékkel gátolta, ami kétszerese az altatást előidéző minimális alveoláris koncentrációnak (MAC). A kloroform IC_{50} értéke valamivel magasabb, ~1,67 mM volt, ez is megfeleltethető kb. 1,5 MAC értéknek. A többi általunk vizsgált anesztetikum kevésbé bizonyult hatékonynak a klinikailag releváns koncentráció tartományban: az izoflurán a PregS által kiváltott TRPM3 aktivációval szembeni IC_{50} értéke 3 MAC-nak (~1,1 mM), míg a szevoflurán esetében 10 MAC-nak (3,8 mM) adódott. A fenti anesztetikumok 1 mM koncentrációban alkalmazva a PregS aktivációs görbéjét a magasabb koncentráció tartomány felé tolták el. Ebben az esetben is a halotán bizonyult a legpotensebbnek, a PregS EC_{50} értékét 50-szeresére növelve. Összehasonlítva a TRPM3 anesztetikumokra való érzékenységét azon ioncsatornák anesztetikumok iránti érzékenységével, melyek bizonyítottan szerepet játszanak az anesztetikumokkal kiváltott altatás folyamatában, a TRPM3 érzékenysége

valamivel alacsonyabbnak mondható. A különböző anesztetikumok a klinikailag releváns koncentráció tartományban (mely 1 MAC értéknek feletethető meg), aktiválják a K_2P csatorna család számos tagját, melyek K^+ konduktancia növelésével hozzájárulnak a negatív membrán potenciál kialakulásához. A TASK-1 által mediált K^+ áramok tekintetében a halotán esetében az EC_{50} érték 0.23 mM míg a szevoflurán esetében 0.29 mM. Sőt mi több, korábbi kutatások bemutatták, hogy a NMDA receptor által mediált áramok effektíven gátlódnak 0.25-1.3 MAC tartomány közé eső EC_{50} értékkel. Az izoflurán és szevoflurán 1 MAC-nak megfelelő koncentrációban potencírozó hatással vannak a $GABA_A$ receptor GABA által kiváltott aktivációjára. Mindazonáltal a halotán esetében az általunk mért TRPM3 ioncsatornát befolyásoló értékek nagyon hasonlóak a halotán által kiváltott NMDA receptort gátló (IC_{50}= 0.57 mM, mely ~2MAC) és $GABA_A$-t potencírozó (EC_{50}=0.67 mM, mely ~2MAC) értékekhez.

Habár növekvő számú bizonyíték támasztja alá, hogy az anesztetikumok direkt módon képesek befolyásolni különböző TRP csatornák működését, egyelőre még limitált tudással rendelkezünk az e mögött rejlő mechanizmus és a lehetséges molekula kötődési helyek tekintetében. Korábbi TRPV1-et és TRPA1-et célzó kutatások rávilágítottak arra, hogy a pórus formáló domén fontos szerepet játszhat az anesztetikum kötőhelyének kialakításában, ugyanakkor más kutatások során készült szimulációk a TRPV1 ioncsatornán többszörös kötőhelyek lehetőségét vetik fel. Ugyan saját kutatásunk során nem vizsgáltuk az anesztetikumok TRPM3-at moduláló hatásmechanizmusát, azonban elektrofiziológiai méréseink alapján azt tapasztaltuk, hogy az anesztetikumok nemcsak az endogén PregS által aktivált TRPM3 klasszikus pórusán átfolyó áramokat, hanem az exogén CIM0216 által kiváltott alternatív permeabilitási útvonalon átfolyó áramokat is gátolták. Ezen eredményeink arra utanak, hogy a vizsgált anesztetikumok nem valamelyik pórust blokkolják szelektíven hanem inkább a csatorna egészének a működését akadályozzák, valószínűsíthetően csatorna kapuzását kísérő konformáció változást gátolják.

Megvizsgálva az anesztetikumok natív TRPM3-ra gyakorolt hatását is azt tapasztaltuk, hogy 1 mM koncentrációban alkalmazva minden általunk vizsgált anesztetikum gátolja az egér DRG-kból izolált szenzoros neuronokon kifejeződő natív TRPM3 ioncsatornát is. A kísérleteinkből származó adatok alapján megállapítható, hogy az anesztetikumok TRPM3-at gátló hatása reverzibilis és gyorsan kimosható.

Eredményeink nem csak egy újabb, az anesztetikumok által befolyásolt ioncsatornát mutatnak be, de az anesztetikumok analgetikus hatásainak újabb lehetséges mechanizmusait tárják fel és növelik a tudásunkat a szenzoros funkciókat is szabályzó TRPM3 ioncsatorna farmakológiai interakcióval kapcsolatban is. Így értékes információval szolgálhatnak új típusú, a TRPM3-on ható fájdalomcsillapítók fejlesztéséhez is, ugyanis a TRPM3 gátlása, mint azt a korábban eredmények is alátámasztják, hatékony stratégiát jelenthet a fájdalom csillapításában, fájdalomhoz köthető szindrómák kezelésében. A TRPM3 gátlószerek közül a növényi flavovon származék isosakuranetinről és az antiepilepsziás gyógyszerként használt primidonról is kimutatták, hogy *in vivo* állatmodellekben is gátolják a fájdalom kialakulását.

Az illékony anesztetikumok tényleges TRPM3 gátlószerként való klinikai alkalmazási lehetőségeit ugyan limitálja, hogy az anesztetikumok affinitása a TRPM3 felé alacsonyabbnak bizonyult, mint más, terápiás célpontjaik irányába, (pl. $GABA_A$ és K_2P csatornák), vizsgálataink számos új eredménnyel szolgálhatnak további, a TRPM3-at mint potenciális fájdalomcsillapító targetet célzó kutatásoknak.

A TRPM3 ioncsatorna viszketésben betöltött szerepének vizsgálata

A súlyos akut és krónikus viszketés az egyik legelterjedtebb bőrgyógyászati tünet a világon, mely számos páciens életét képes megkeseríteni. Az elmúlt években számos olyan kutatás indult mely különböző mediátorok, receptorok, molekuláris interakciók és jelátviteli utak a viszketés kialakulásában betöltött szerepének

vizsgálatát tűzték ki célul, ezáltal lehetőséget teremtve, új típusú bőrgyógyászati terápiás eszközök és gyógyszerek kifejlesztésére. Sokáig nyitott kérdésnek számított, hogy vajon beszélhetünk-e egy autonóm, a fájdalmat érzékelő idegpályáktól elkülönülő viszketés érzékelő rendszerről. Mára elfogadott az a számos bizonyítékkal is alátámasztott teória, miszerint a viszketést érzékelő szenzoros neuronok (pruritogén neuronok), egy specializált alpopulációt alkotnak a fájdalomérzékelő neuronokon (nociceptív neuronok) belül. Mindemellett az is bizonyított, hogy a nem pruritogén érzékeny nociceptív neuronok nem aktiválódnak a különböző pruritogén anyagok hatására. Ezen funkcionális különbség okát a pruritogén érzékeny és pruritogén érzéketlen nociceptív neuronok között molekuláris szinten kell keresnünk. Így nem meglepő, hogy számos kutatás célja, a viszketés specifikus molekuláris markerek, viszketés specifikus neuronok és neurális hálózatok azonosítása, mely célokat nagyban motiválja az orvostudományi igény a fájdalom és viszketéscsillapításhoz szükséges szelektív farmakoterápiás targetek azonosítására. Számos viszketést okozó pruritogén anyag receptorát azonosították már, a bőrt beidegző szenzoros neuronokon emberben és egérben is egyaránt. Ilyen receptorok például a H1 hisztamin receptor, a klorokin érzékeny G-fehérje kapcsolt receptor (MRGPRA3), a BAM8-22 érzékeny receptor (MRGPRC11) vagy a PAR2 receptor. Mindazonáltal a közelmúltban folytatott kutatások felfedték néhány, a fájdalom kialakulásában már ismerten szerepet játszó ioncsatorna szerepét a viszketés kialakulásban is. Ilyen csatornák például, a TRP csatornák családján belül a hőérzékeny TRPV1 és TRPA1, melyek egyaránt kifejeződnek a fájdalom és viszketés érzékeny neuronokon, és kiemelt szereppel bírnak mind a két szenzoros funkcióban. Más hőérzékeny TRP csatornákról is bebizonyosodott, hogy mind a viszketés, mind pedig a fájdalom kialakulásában is szerepet játszanak. A TRPV3 és TRPV4 ioncsatornák nagyrészt a bőr nem neurális sejtjein fejeződnek ki, és kiemelt szerepet játszanak a főként gyulladásos folyamatokhoz köthető endogén pruritogén és algogén anyagok felszabadításában. Korábbi

kutatások leírták, hogy a TRPV4 szerepet játszik az allergiás folyamatokhoz köthető és az attól független viszketés kialakulásában is azáltal, hogy szabályozza az 5-HT felszabadulást a hízósejtekből és a keratinocytákból, mely utóbbi sejtekben történő aktiválódása további ET-1 felszabadulást eredményez, de kiemelt szereppel bír a napégés okozta fájdalom kialakulásban is. Az 5–HT nem-neurális sejtekből történő felszabadításán kívül a TRPV4 fontos szerepet játszik a viszketés érzékeny neuronokban is az 5-HT által kiváltott viszketés kialakulása során. A TRPV3 szintén magasan expresszálódik keratinocyta sejtekben és aktivációja hozzájárul a gyulladásos folyamatok mellett a viszketés számos formájának kialakulásához, azáltal, hogy a TRPV4-hez hasonlóan gyulladásos és pruritogén mediátorokat szabadít fel.

Annak ellenére, hogy viszonylag sok adat áll már rendelkezésünkre a különböző TRP csatornák viszketésben betöltött szerepéről, a szintén hő- és fájdalom érzékeny ioncsatorna TRPM3 viszketésben betöltött szerepét eddig még nem vizsgálták. A szenzoros idegvégződésekben kifejeződő TRPM3 aktivációja, fájdalmas meleg, illetve az endogén neurosteroid PregS hatására fájdalmas ingerek továbbítását okozza rágcsálókban. A csatorna egyes ligandjai, vagy ligandjainak speciális kombinációi, egy alternatív permeabilitási útvonalat nyitnak a csatornán keresztül, mely negatív membránpotenciálon, egy erős depolarizáló áramot eredményez, melynek hatására a fájdalom érzet súlyosbodik. Korábbi kutatások bemutatták, hogy a TRPM3 ioncsatorna funkciója a fájdalom érzékelő rendszeren belül, nagy átfedésben van más hőérzékeny fájdalom érzékelésben is szerepet játszó TRP csatornákkal. A TRPM3, a TRPV1-el és TRPA1-el közösen, fontos szerepet játszik a termális hiperalgézia okozta gyulladásos folyamatokban, és a meleg indukálta fájdalmas ingerek transzdukciójában. A funkcionális hasonlóságok mellett a hátsógyöki ganglionok szomatoszenzoros neuronjain az expressziójuk is nagymértékben átfed. A TRPV1 és TRPA1 a fájdalomban betöltött szerepükön kívül, fontos résztvevői a szenzoros idegvégződésekben végbemenő, viszketéshez köthető szenzoros transzdukció

folyamatának is. Ez a funkcionális és anatómiai hasonlóság alapozta meg azt a feltételezést, hogy a szomatoszenzoros neuronokon expresszálódó TRPM3, a TRPV1 és TRPA1 csatornákhoz hasonlóan, a viszketéshez köthető transzdukciós folyamatokban is szerepet játszhat. Ennek során jellemzően a pruritogén anyagok saját receptorukhoz kötődve másodlagos jelátviteli útvonalakat aktiválnak és ez vezet a valamely korábban tárgyalt TRP csatorna közvetett aktiválódásához. A TRPV1 szerepet játszik a hisztamin receptor és proteináz aktiválta receptor 2 (PAR2) által aktivált jelátviteli útvonalakban, míg a TRPA1 fontos résztvevő az 5-HT, Mas-Related G-fehérje kapcsolt (MRGPS) aktivátorok, TSLP és epesav által kiváltott nem hisztaminerg pruritogén folyamatok továbbításában.

A TRPM3 ioncsatorna potenciális szerepét vizsgálva a viszketés kialakulásában és szabályozásában *in vivo* egér viselkedés teszteket és *in vitro* intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változást mérő módszereket alkalmaztunk. Kísérleteink során a vad típusnak megfeleltethető *Trpm3*$^{+/+}$ és *Trpm3*$^{-/-}$ C57Bl6 típusú hím egyedeket használtunk. A *„cheek modell”* használatával szerzett *in vivo* kísérletes eredményeink tovább erősítették a korábbi kutatások eredményeit, miszerint a csatorna szelektív farmakológiai aktiválása fájdalom kialakulását okozza, mind a trigeminális, mind a hátsógyöki ganglionok által beidegzett területen is, mely hatás a TRPM3 genetikai hiányában megszűnik. Emellett, eredményeink bizonyítják, hogy a TRPM3 agonisták nem okoznak viszketéshez köthető viselkedéses válaszokat a *„cheek modell”* alkalmazása során, mely előrevetíti azt a feltételezést, miszerint a TRPM3 ioncsatorna aktivációja önmagában nem okoz viszketést. Azonban, annak ellenére, hogy a csatorna aktivációja kizárólag fájdalomhoz köthető viselkedéses válaszok megjelenését indukálta, eredményeink nem zárják ki annak lehetőségét, hogy a TRPM3 ioncsatorna a pruriceptív szenzoros neuronokon kifejeződve nem játszhat közvetett szerepet a viszketéshez köthető szignáltranszdukcióban. A kutatásunk során azt vizsgáltuk, hogy a TRPM3 ioncsatorna szerepet játszik-e a hisztamin, 5-HT és ET-1 endogén pruritogén mediátorok által közvetített hatások során. Eredményeink azt

bizonyítják, hogy szubkután injekciót követően, a használt endogén pruritogén mediátorok mindegyike, hasonló erősségű viszketést váltott ki *Trpm3*$^{+/+}$ és *Trpm3*$^{-/-}$ egerekben, mind a trigeminális neuronok által beidegzett pofa régióban, mind pedig a hátsógyöki ganglionok által beidegzett tarkó-gerinc régióban. Ezen *in vivo* eredményeinkkel teljesen összhangban, trigeminális ganglionokból izolált, hisztamin, 5-HT, és ET-1 kezelés hatására aktiválódott szenzoros neuronok arányára a *Trpm3* genetikai hiánya nem volt hatással, annak ellenére sem, hogy a vizsgált pruritogének mindegyike aktivált a *Trpm3*$^{+/+}$ típusú egérből származó TRPM3-at expresszáló (PregS+) és nem expresszáló (PregS-) neuronokat egyaránt. Sőt mi több, a TRPM3 farmakológiai gátlása izozakuranetinnel sem befolyásolta a különböző pruritogének által aktivált *Trpm3*$^{+/+}$ egérből származó válaszoló TG szenzoros neuronok arányát, sem pedig a kiváltott Ca^{2+} tranziensek amplitúdóját. Ezen eredményeink meggyőző érveket szolgáltatnak ahhoz a következtetéshez, miszerint a TRPM3 ioncsatornának nincs szignifikáns szerepe a hisztamin, 5-HT és ET-1 által kiváltott sejtes válaszokban, ezáltal nem járul hozzá az általuk kiváltott viszketés kialakulásához.

Azonban az ET-1 injekciót követően a *Trpm3*$^{-/-}$ állatoknál szignifikánsan magasabb intenzitású vakaródzási válaszokat figyeltünk meg. Ezen eredményünk nagy valószínűség szerint magyarázható azzal az általános megfigyeléssel, és kísérletes ténnyel, miszerint a fájdalom gerincvelői szinten gátolja a viszketés transzdukcióját. Saját eredményeinket figyelembe véve, elképzelhető, hogy a TRPM3 genetikai hiánya, a fájdalom érzékeny neuronok alap aktivitásának csökkenését eredményezheti, mely bizonyos esetekben a viszketés intenzitásának fokozódását válthatja ki. Természetesen nem zárható ki az sem, hogy maga az ET-1 a nociceptorok enyhe aktiválását okozza, ami részlegesen gátolja a viszkető válaszokat, és ez a feltételezett gátlás a *Trpm3*$^{-/-}$ állatokban csökkent a *Trpm3*$^{+/+}$ állatokhoz viszonyítva. Az ET-1-ről szintén leírták, hogy szerepe van a fájdalom közvetítésében, azonban kísérleteinkben csak mérsékelt nocifenzív viselkedést

tapasztaltunk, és az általunk megfigyelt viszketés ráció érték is főként pruritogén anyagként jellemzi.

A projekthez tartozó kísérletes eredményeink, arra a következtetésre vezetnek, hogy a TRPM3 ioncsatorna specifikus a fájdalomra, és nem vesz részt, különböző endogén pruritogén anyagok, mint a hisztamin, 5-HT, és ET-1 által kiváltott viszketés transzdukciójában. Mindazonáltal nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét, a TRPM3 szükséges és fontos résztvevője esetleg más ligandok vagy mechanizmusok által kiváltott viszketéses folyamatoknak. Eredményeink ismételten aláhúzzák annak a lehetőségét, hogy a TRPM3 kiváló jelölt különböző fájdalom specifikus kezeléseket célzó kísérletek célpontjának. Korábbi kutatások kimutatták, hogy a TRPM3 farmakológiai gátlása vagy geneteikai hiánya csökkenti a TRPM3 agonisták, a hőmérséklet és a gyulladás által kiváltott fájdalom érzetet a DRG neuronok által beidegzett területeken. Ezt kibővítve, a *„cheek modell”* alkalmazásával elért eredményeink demonstrálják, hogy az endogén PregS és az exogén CIM0216 által kiváltott fájdalom, eltűnt a *Trpm3*$^{-/-}$ egerekben, a trigeminális szenzoros neuronok által beidegzett pofa régióban is.

Mint minden állatkísérletes kutatás esetében, a jelen projekt során is fontos felmérni az eredményeink emberre vonatkoztatott transzlációjának lehetőségét. Bár a legjobb tudásunk szerint a TRPM3 ligandok hatásait még nem vizsgálták humán *in vivo* kísérletek során, az ismert farmakológiai és celluláris adatok azt sugallják, hogy az egérben és az emberben megtalálható vad típusú TRPM3 funkcionálisan nagyon hasonlóak: a foszfolipidek, valamint a G fehérjék ßγ alegységei által hasonlóan szabályozottak, és az agonisták és antagonisták is megegyeznek. Az általunk alkalmazott *„cheek modell”*, kíváló kísérletes módszer a fájdalom és viszketés során tapasztaltalt viselkedéses válaszok elkülönítésére, és az általunk alkalmazott endogén pruritogén mediátorokról úgy, mint hisztamin 5-HT és ET-1, mind egér mind pedig humán vonatkozásban bizonyított, hogy viszketést indukálnak.

In vivo és *in vitro* kísérletes eredményeink fényében levonható az a következtetés, hogy a TRPM3 ioncsatorna egér és humán esetben sem vesz részt az endogén pruritogének által indukált viszketés kialakulásában, és direkt kémiai aktivációja fájdalmat és nem viszketést vált ki.

Összefoglalás

Független kutatócsoportok és kollaborációs partnereink már korábban leírák a TRPM3 ioncsatorna molekuláris és funkcionális tulajdonságait, valamint szerepét a hőmérséklet érzékelésben és a fájdalom kialakulásában. Jelen munkánk során, *in vitro* vizsgáltuk az általános altatást igénylő műtétek során széleskörűen alkalmazott illékony anesztetikumok hatását a TRPM3 ioncsatorna működésére, és *in vitro* és *in vivo* módszerekkel megvizsgáltuk a TRPM3 ioncsatorna hisztamin függő és hisztamin független viszketés kialakulásában való potenciális szerepét. Az illékony anesztetikumokkal való munka során először is gázkromatográfiás és tömegspektometriás mérésekkel kimutattuk, hogy belőlük 10 mM-os koncentrációjú vizes alapú oldatok készíthetők, amik az általunk használt 45 perces kísérleti időtartam alatt stabilnak tekinthetők. Fluoreszcens alapú intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változást mérő kísérleteink során kimutattuk, hogy az illékony anesztetikumok, úgymint a halotán, kloroform, izoflurán és szevoflurán, hatékonyan és dózis függő módon képesek gátolni, mind a TRPM3 agonista endogén PregS és exogén CIM0216 általi, mind pedig a hőmérséklet emelkedés által kiváltott rekombináns TRPM3 aktivációját. A vizsgált anesztetikumok közül a halotán bizonyult a TRPM3 ioncsatorna legpotensebb gátlószerének. Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a vizsgált anesztetikumok 1 mM-ban alkalmazva részlegesen, míg 5 mM ban szinte teljesen gátoljak a TRPM3 ioncsatorna által mediált transzmembrán áramokat is. Vizsgálatinkból kiderült, hogy az anesztetikumok nem csak a PregS által nyitott TRPM3 klasszikus pórusán átfolyó áramokat gátolják, hanem a CIM0216 jelenlétében megnyíló alternatív póruson átfolyó transzmembrán áramokat is. Egér hátsógyöki ganglionjaból izolált szenzoros neuronokon kifejeződő TRPM3 ioncsatornát az általunk vizsgált anesztetikumok szintén hatékonyan és reverzibilis módon gátolták 1mM koncentrációban.

A TRPM3 ioncsatorna viszketésben betöltött szerepének vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a TRPM3 ioncsatorna nem vesz részt sem a hisztamin függő,

sem pedig a hisztamin független viszketéses folyamtok kialakulásában. A *„cheek modell”* alkalmazása során, mely módszer lehetővé teszi a fájdalom és viszketésre adott viselkedéses válaszok elkülönítését, bevezettünk egy új paramétert, a viszketés rációját ($R_{viszketés}$). Az $R_{viszketés}$ megadja a *„cheek modell”* során használt anyagok specificitását a viszketés fájdalom tengelyén. Kísérleteink során bemutattuk, hogy a TRPM3 ioncsatorna agonistái, az endogén PregS és az exogén CIM0216, *Trpm3*$^{+/+}$ állatokban kizárólag fájdalmat indukáltak, ami a *Trpm3*$^{-/-}$ állatokban elmaradt, viszketést pedig egyik genotípusban sem okoztak. Ezzel szemben az endogén pruritogének mindkét csoportban hasonló mértékű viszketést váltottak ki a TRPM3-tól függetlenül. *In vivo* viselkedéses eredményeinket *Trpm3*$^{+/+}$ és *Trpm3*$^{-/-}$ egerek TG-ból izolált szenzoros neuronokon végzett *in vitro* intracelluláris Ca^{2+} koncentráció mérésekkel validáltuk. Kimutattuk, hogy a vizsgált prutiogén anyagok a TRPM3 genetikai hiányában és jelenlétében is hasonló módon hatnak, és a TRPM3 ioncsatorna farmakológiai gátlása nincs befolyással a pruritogének által kifejtett hatásokra.

FÜGGELÉK

DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/4/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kelemen Balázs
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10056714

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kelemen, B.**, Pinto, S., Kim, N., Lisztes, E., Hanyicska, M., Vladár, A., Oláh, A., Pénzes, Z., Shu, B., Vriens, J., Bíró, T., Rohács, T., Voets, T., Tóth, I. B.: The TRPM3 ion channel mediates nociception but not itch evoked by endogenous pruritogenic mediators.
   Biochem. Pharmacol. 183, 1-11, 2021.
   DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114310
   IF: 4.96 (2019)
2. **Kelemen, B.**, Lisztes, E., Vladár, A., Hanyicska, M., Almássy, J., Oláh, A., Szöllősi, A. G., Pénzes, Z., Posta, J., Voets, T., Bíró, T., Tóth, I. B.: Volatile anaesthetics inhibit the thermosensitive nociceptor ion channel transient receptor potential melastatin 3 (TRPM3).
   Biochem. Pharmacol. 174, 1-14, 2020.
   DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113826
   IF: 4.96 (2019)

DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

További közlemények

3. Kemény, Á., Kodji, X., Horváth, S., Komlódi, R., Szőke, É., Sándor, Z., Perkecz, A., Gyömörei, C., Sétáló, G., **Kelemen, B.**, Bíró, T., Tóth, I. B., Brain, S. D., Pintér, E., Gyulai, R.: TRPA1 Acts in a Protective Manner in Imiquimod-Induced Psoriasiform Dermatitis in Mice.
J. Invest. Dermatol. 138 (8), 1774-1784, 2018.
DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2018.02.040
IF: 6.29

4. Ambrus, L., **Kelemen, B.**, Szabó, T., Bíró, T., Tóth, I. B.: Human podocytes express functional thermosensitive transient receptor potential vanilloid (TRPV) channels.
Br. J. Pharmacol. 174 (23), 4493-4507, 2017.
DOI: http://dx.doi.org/10.1111/bph.14052.
IF: 6.81

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 23,02
A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 9,92

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2021.01.07.

DEBRECENI EGYETEM * Egyetemi és Nemzeti Könyvtár *