A Transiens Receptor Potenciál Ankyrin 1 (TRPA1) és Vanilloid 1 (TRPV1) receptorok jelenléte és expresszió-fokozódása endometriózis transzlációs patkánymodelljében

Pohóczky Krisztina^{1,2,3}, Bohonyi Noémi⁴, Maczkó Péter¹, Kajtár Béla⁵, Helyes Zsuzsanna^{1,3}

¹Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

²Pécsi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszerhatástani Tanszék

³Pécsi Tudományegyetem Szentágotthai János Kutatóközpont & Idegtudományi Centrum

⁴Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ, Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika

⁵Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar, Patológiai Intézet

AUTHOR AFFILIATION

¹University of Pécs Medical School, Department of Pharmacology and Pharmacotherapy

²University of Pécs Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology

³University of Pécs Szentágotthai Research Centre, Centre for Neuroscience

⁴University of Pécs Medical School, Department of Obstetrics and Gynaecology

⁵University of Pécs Medical School, Department of Pathology

CORRESPONDING AUTHOR

Zsuzsanna Helyes

Institution, Department: University of Pécs Medical School, Department of Pharmacology and Pharmacotherapy
Postal address: H-7624 Pécs, Szigeti street 12.
Email: zsuzsanna.helyes@aok.pte.hu

ARTICLE HISTORY

Received: 9-May-2019

Accepted: 31-Aug-2019

DOI: 10.2478/orvtudert-2019-0011

Presence and upregulation of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) and Ankyrin 1 (TRPA1) in translational rat endometriosis model

ABSTRACT

The Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) and Ankyrin 1 (TRPA1) are non-selective cation channels predominantly localized on capsaicin-sensitive sensory neurons; however both receptors have been described in non-neuronal tissues. It has been published that both receptors upregulated in peritoneal endometriosis in humans. Our research group demonstrated that TRPA1 and TRPV1 expression is elevated in human deep infiltrating endometriosis (DIE) lesions and the receptors have an estrogen-dependent expression pattern in rat endometrium. Here, we investigated the expression changes of TRPA1/V1 and the role of the capsaicin-sensitive sensory-nerve endings in a rat model of peritoneal endometriosis. Peritoneal endometriosis was surgically induced in 8-week-old female rats (n=7-7) for 2-weeks (acute condition) and 8-weeks (chronic condition). TRPA1/V1 mRNAs were quantified with quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The expression levels were compared with the results obtained earlier from human DIE samples. The blockade of the TRPA1/V1 expressing capsaicin-sensitive nerve endings was induced with resiniferatoxin (RTX), followed by the measurement of the weight and size of the endometriosis lesions. We detected TRPV1 and TRPA1 mRNA in normal rat endometrium, their expression was not altered in sham-operated animals. In chronic, but not in acute endometriosis the expression was significantly elevated in the lesions, which results are consistent with our previous findings in human DIE. The elimination of capsaicin-sensitive nerve endings decreased the weight of the endometriosis lesions while the size of the ectopic tissue was not altered. Taken together, our results obtained from the rat endometriosis model are consistent with the previous human results, therefore this model is considered to have translational significance and it is suitable for functional analysis of

the ion channels. The local, non-neuronal TRPA1 and TRPV1 might play a role in inflammation and sensory neuronal activation in endometriosis related pain, which is mediated by a broad range of pro-inflammatory molecules.

Keywords: TRPV1, TRPA1, endometriosis, pain

KIVONAT

A Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1 (TRPV1) és Ankyrin 1 (TRPA1) receptorok olyan polimodális nem szelektív kationcsatornák, melyek a központi- és perifériás idegrendszer mellett számos nem neurális struktúrán is expresszálódnak és sokféle exogén és endogén stimulusal ingerelhetők ill. szenzitizálhatók. Peritonealis endometriosisban TRPV1 és TRPA1 expresszióemelkedését mutatták ki az ectopiás endometriumban és a peritoneumban. Munkacsoportunk bizonyította elsőként e receptorok expresszióját mélyen infiltráló endometriosis léziókban és eutopiás endometriumban, valamint hasonló megjelenését, ösztrogénhatásra történő fokozódását és funkcionálisát patkány méhnyálkahártyában. Ezekre alapozva jelen kísérleteinkben a TRPA1 és TRPV1 receptorok expresszióváltozásait és a receptorexpresszálo szensoros idegek szerepét vizsgáltuk peritonealis endometriosis patkánymodelljében, a modellrendszer transzlációs jelentőségének igazolására. Homológ patkánymodellben az uterus auto-transzplantációját végeztük el a hasüregben akut endometriosis (2 hét, n=7), krónikus endometriosis (2 hónap, n=7), akut álműtött (n=4), krónikus álműtött (n=4) csoportokban. A receptorok expresszióját mRNS szinten kvantitatív poli-

meráz láncreakcióval vizsgáltuk, eredményeinket összehasonlítottuk korábban publikált, humán endometriosis mintákon nyert eredményeinkkel. A TRPV1/A1-expresszálo, ún. „kapszaicinérzékeny” peptid tartalmú fájdalomérző idegek funkciójának gátlására az ultrapotens TRPV1 agonista reziniferatoxin (RTX) előkezelést alkalmaztuk, a kialakuló endometriosis léziók tömegét és méretét határoztuk meg. Patkány akut endometriosisban (2 hét) nem detektáltunk változást sem a TRPA1 sem a TRPV1 receptor expressziójában, azonban krónikus folyamatokban (8 hét) a humán eredményekhez hasonlóan szignifikáns expressziónövekedést mértünk az endometriosis léziókban. Eutopiás endometriumban a TRPA1 esetében nem, a TRPV1 esetében szintén szignifikáns mRNS expressziófokozódást detektáltunk, amely szintén összhangban áll a korábban klinikai mintákban mért eredményeinkkel. A kapszaicinérzékeny idegelemek kiiktatása után az endometriosis léziók tömege szignifikánsan csökkent, azonos méretek mellett. Mivel patkánymodellből nyert mintáink TRPA1/V1 expressziós eredményei a klinikai mintákban detektáltakal nagyon hasonlóak voltak, ez az endometriosis modell e szempontból transzlációs jelentőségűnek és az ioncsatornák funkcionális jelentőségének vizsgálatára alkalmasnak tekinthető. E receptorokat kifejező érzőideg-végződés aktivációja hozzájárul az endometriosisos gócek tömegnövekedéséhez feltételezhetően az ödémaképződés révén, amely hozzájárulhat a perzisztáló fájdalom kialakulásához is.

Kulcsszavak: endometriosis, TRPA1, TRPV1, fájdalom, kapszaicinérzékeny érzőideg

Bevezetés: irodalmi háttér, kutatásaink előzményei és indokoltsága

Az endometriosis és kórélettani mechanizmusai

Az endometriosis komplex gyulladásos kórkép, amelyben az endometriális mirigyek és a sztróma ectopiásan, a méh üregén kívül is megtalálható. Ez az ectopiás endometrium hormonfüggő, követi a menstruációs ciklus során megfigyelhető differenciálódási és proliferációs fázisokat. Az endometriosis leggyakrabban vérrel telt kismencedei terime képében jelenik meg, több gócban (1). Tipikusan a kismencedei képletek érintettek, mint például a méh ligamentumai, a petefészek, petevezetők és a Douglas-üreg, de előfordulhat nyirokcsomóban, tüdőben és izomszövetben is. Diagnózisa összetett, a klinikai tünetek a rendellenes gócek helyére utalhatnak, azonban az érintettek egyharmada tünetmentes. Az endometriosis jellemző tünetei közé tartozik a súlyos, ciklusos fájdalom (*dysmenorrhoea*, DM), amely az elváltozással

járulékosan jelentkező kismencedei összenövések és vérzés eredménye. Ezen kívül sok esetben fájdalmas lehet a vizezés (*dysuria*), a közösülés (*dyspareunia*), és a székelés (*dyschezia*), további panasz lehet az infertilitás, amely a *tuba uterina* mechanikai elzáródásának vagy a beágyazódás gátlásának következménye. A betegség atipikus formája, mikor az endometriosis gócek extragenitális szerveken helyezkednek el. A megjelenés helye szerint beszélünk *endometriosis extragenitalis*, *endometriosis interna* és *endometriosis externa* kórképekről. Ez utóbbi, az endometriosis externa a leggyakoribb forma, amely lokalizáció szerint lehet ovarialis, retrocervicalis, pelvicus peritonealis, vaginalis és cervicalis (2, 3).

Az endometriosis korszerű kezelési stratégiái, terápiás kihívásai

Az endometriosis terápiája a kórkép krónikus gyulladásos és hormonális faktorai, valamint a többféle formában jelentkező erős fájdalom miatt nagy kihívást jelent. Amennyiben a páciens családtervezési tervei ezt lehetővé

teszik, akkor kombinált hormonális, ösztrogén és gesztagen tartalmú fogamzásgátlók folyamatos, vagy periodikus alkalmazására kerül sor (4). A kezelés az esetek jelentős részében enyhíti a fájdalmat és relatíve jól tolerálható mellékhatásokkal jár. Terápiás sikertelenség esetén laparoszkópiás beavatkozás vagy ösztrogén hatású vegyületet nem tartalmazó gyógyszeres kezelés a választandó. A fogamzásgátló készítmények hatástalanságának egyik oka az ectopián megjelenő endometrium szövet csökkent vagy hiányzó progeszteron receptor expressziója, amely a proliferatív hatások túlsúlyba kerülését eredményezi. Az endometriosis progressziója szempontjából előnyös a teljes amenorrhea, azonban az ösztrogén nem-genitális szervekre kifejtett hatásainak elmaradása miatt iatrogen menopausa alakulhat ki. A sebészeti megoldások közül a laparoszkópiás beavatkozás megerősítheti a diagnózist és egyben lehetőséget kínál a nagyobb méretű góccok eltávolítására és az összenövések sebészeti feloldására. A beavatkozást követően a kezelt betegek 50%-a tünetmentessé válik. (5). A sebészeti beavatkozások általános kockázatain felül a bármilyen okból újra operált betegek egy részében a korábbi műteti hegekben jelenhet meg az elváltozás (3). Az endometriosis terápiája a betegség gyulladásos és hormonális vonatkozásai miatt nehéz, a jelenleg alkalmazott kezelés mellett gyakran következik be relapsus. Mivel a betegség elsősorban a fiatalabb, gyermekvállalás előtt álló korosztályt érinti,

szükséges nem hormonális eredetű terápiás lehetőségek kutatása, ezáltal potenciális új gyógyszercélpontok azonosítása.

A Tranziens Receptor Potenciál (TRP) receptorok: TRP Ankyrin 1 (TRPA1) és Vanilloid 1 (TRPV1)

A Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1 (TRPV1) és Ankyrin 1 (TRPA1) receptorok a központi- és perifériás idegrendszer (kapszaicinérzékeny peptiderg szenzoros neuronok, vékony mielinhüvelyes (A δ -) és a mielinhüvely nélküli (C-) rostok) mellett számos nem neurális struktúrán is expresszálódnak, pl. keratinocytákon, hízósejteken, dendritikus sejteken, gastrointestinalis epithelsejteken, érfali simaizomsejteken, makrofágokon és T-lymphocytákon, nagyon gyakran kolokalizáltak (6–8). Polimodális szenzor funkciójú nem szelektív kation csatornák, melyek számos exogén és endogén stimulussal ingerelhetők ill. szenzitizálhatók. A fájdalmas meleg (>43°C), a csípős paprika alkaloidja a kapszaicin, endogén fájdalom- és gyulladások mediátorok (pl. bradikinin, protonok, anandamid (9), 12-hidroperoxi-eikozatetraénsav, N-arachidonoil-dopamin) a TRPV1, a hideg inger (<17°C), a fahéjaldehid és mustárolaj, formaldehid, hidrogén peroxid és metilglioxál a TRPA1 aktivátorai (1. ábra).

Az utóbbi évtizedben a TRPV1-et, TRPA1-et és splice-variánsait a méhben is leírták (10,11).

1. ábra. A TRPV1 (A) és TRPA1 (B) receptorok aktivációs mechanizmusai.

A TRPA1 és TRPV1 az endometriumban

Az utóbbi években a TRPV1 receptor humán endometriosisban történő leírása további adatokat szolgáltatott a nem-neuronális expresszió jelentőségére. Endometriosis eredetű sejt kultúrában strómasejteken prosztaglandin E₂ (PGE₂) és tumor nekrosis faktor α (TNF α) kezelés hatására TRPV1 expresszió növekedést tapasztalható, TRPV1 agonista hatására pedig nitrogén monoxid (NO) és gyulladásos citokin, interleukin 1-beta (IL-1 β) felszabadulás következik be (12). Endometriosis eredetű krónikus kismencedei fájdalomban emelkedett extraneurális TRPA1 és TRPV1 expresszió figyelhető meg a peritoneumban, illetve emelkedett TRPV1 mRNS szint detektálható ectopiás endometrium sejtekben. Humán embrionális őssejtekből differenciáltatott szenzoros neuronokban 17- β ösztadiol és a β -ösztrogénreceptorra szelektív 2,3-bisz(4-hidroxi-fenil)-propionitril hatására TRPV1 expresszió növekedés következik be, amely a receptor ösztrogénfüggő expresszióját igazolja (13). A TRPV1 expresszió ösztrogénfüggése magyarázatul szolgálhat az endometriosis kezelése során alkalmazott, hormonszuppressziót követő tünetcsökkenésre endometriosis-asszociált kismencedei fájdalomban. Munkacsoportunk írta le először a TRPA1 receptor mRNS expresszióját patkány endometriumban, valamint a TRPA1 és TRPV1 receptorok expresszió növekedését gén- és fehérjeszinten is szintetikus ösztrogén analóg vegyület hatására. A TRPA1-agonista formalin (14) és a TRPV1-agonista kapszaicin előkezelés után primér endometrium sejt kultúrában NOS és IL-1 β expresszió növekedés következik be, amely szintén a receptorok nem-neurális aktivációjához köthető. Ezek a mediátorok a ciklus során feltételezhetően részt vesznek az endometrium szövet lokális szabályozásában, ezen belül az NO-közvetített vazodilatációban, valamint az ovuláció, terhesség és decidualisatio kialakulásában (15–17). A receptorok funkcionalitását támasztja alá Greaves és munkacsoportjának tanulmánya is, melyben ectopiás endometrium sejtekben TRPA1 és TRPV1 aktiváció hatására NO és IL-1 β felszabadulást mértek (13). Korábban munkacsoportunk mélyen infiltráló endometriosis (deep infiltrating endometriosis, DIE) betegekből származó műtéti mintákban ugyancsak megfigyelte a receptor mRNS szintének emelkedését, melyet fehérjeszinten, specifikus immunhisztokémiai jelölésekkel is alátámasztottunk. Ezen túlmenően, vizuál analóg skála (VAS) segítségével vizsgáltuk a betegek fájdalom paramétereinek intenzitását, melyek közül egyes paraméterek korrelációt mutattak a receptor expresszióval.

2. ábra. Endometriosis góccok elhelyezkedése a peritoneumban patkány krónikus endometriosis modellben.

Az endometrium és endometriosis sejteken tapasztalt hormonfüggő és DIE-ban bekövetkező TRPA1 és TRPV1 expresszió fokozódás alapján a következőkben bemutatott vizsgálatainkban célunk a receptorok expressziós változásainak vizsgálata volt, a későbbiekben széleskörű tesztelésre tervezett patkány endometriosis modell transzlációs jelentőségének meghatározására. Kapott eredményeinket összevetettük korábban nyert humán eredményeinkkel, továbbá kísérletes kémiai denerváció segítségével a TRPA1/TRPV1-expresszáló kapszaicinérzékeny érzőidegek endometriosisban betöltött szerepét is vizsgáltuk.

Anyag és módszer: mintagyűjtés, kísérletes modell

Állatok és kezelés

Az endometriosis állatkísérletes modelljében vizsgálatokat a kutatásetikai irányelvek szerint, a kísérlethez felhasznált állatok humánus kezelése mellett végeztük el (engedély száma: BA02/2000-27/2016). A felhasznált állatok a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetének Állatházából származnak. Az állatok elhelyezése szabványos állatházi ketrecekben történt, 25°C-on, tizenkét órás világos/sötét ciklusban, ad libitum táplálás mellett.

Munkánk során 36 db 8 hetes nőstény Wistar patkányt használtunk fel, melyekből az alábbi vizsgálati csoportokat hoztuk létre: akut álműtött csoport (n=4), krónikus

álműtött csoport (n=4), akut endometriosis (n=7), krónikus endometriosis (n=7). Az akut betegségmodell 2 hétig, a krónikus 8 hétig tartott.

A TRPV1/A1-et expresszáló szenzoros idegek funkciójának vizsgálatára az akut-és krónikus endometriosis vizsgálati csoportokba tartozó patkányok egy-egy csoportjának a műtét előtt 3, 70, 100 µg/kg s.c. 3 egymást követő napon át ultrapotens TRPV1 agonista reziniferatoxint (RTX, Sigma-Aldrich) adtunk, amellyel a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződéseket testszerte működésképtelenné tettük (kémiai "szenzoros denerváció", deszenzitivizáció; 18). Két héttel később a deszenzibilizáció sikerességét kapszaicin (50 µl, 0,1%) szembe cseppentésével ellenőriztük (wiping teszt), a deszenzitivizált állatok nem mutattak szemtörlési reakciót.

Sebészeti úton kiváltott patkány endometriosis modell, mintavétel

Az endometriosis kiváltása alábbiak szerint történt: Steril műtéti körülmények közt, mélyaltatásban (pentobarbital-nátrium 4mg/100gr), a patkányok bal uterus szarvát kimetszettük, majd autogén módon a kimetszett szövetet a mesenterium területén varrással visszahelyeztük (20, 2. ábra). A kísérleti állatokat a műtétet követően 72 órán át megfigyelés alatt tartottuk. A kísérletben az akut fázist 2 hét után, a krónikus fázis 2 hónap után vizsgáltuk. Kontrollként álműtött egyedeket alkalmaztunk, amelyek egy zsírszöveti bemetszésen estek át. A kísérlet végén az állatokat uretánnal (2g/ml) történő mély altatásban termináltuk, méhüket illetve az endometriosis gócot steril úton eltávolítottuk. A minták egy részét RNA Later (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) oldatba helyeztük majd -80°C-on tároltuk molekuláris biológiai feldolgozásra (kvantitatív polimeráz láncreakció: qPCR),

másik részét 4% paraformaldehid oldatba helyeztük szövettani feldolgozás és értékelés céljából.

Az RTX deszenzitivizáció hatásának vizsgálata

A TRPV1 receptort expresszáló érzőideg-végzések funkciója szelektíven gátlható a receptor ultrapotens agonistájával, reziniferatoxinnal (RTX) történő kezelés hatására. Nagy dózisokban adott RTX az idegvégződés funkcionális károsodását okozza, ez a folyamat a deszenzitivizáció, amelyet az idegvégződés fizikai károsodása követhet (más néven ez a kémiai denerváció) (20,21). A patkányok egy-egy csoportjának a kísérlet előtt az RTX (Sigma-Aldrich) emelkedő dózisait (30, 70, 100 µg/kg s.c. 3 egymást követő napon) adtuk, ezzel a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződéseket testszerte működésképtelenné tettük (deszenzibilizáció). Az akut izgató hatások (fokozott nyákszekréció, hörgőgörcs) kivédésére atropint, teofillint és terbutalint tartalmazó injekciót kaptak az állatok. 14 nappal később a deszenzibilizáció sikerességét kapszaicin (50 µl, 0,01%) szembe cseppentésével ellenőriztük (wiping test) (22). Vizsgálataink során az RTX deszenzitivizáció hatását az akut és krónikus formában az endometriosis gócok méretének (mm) és tömegének (g) meghatározásával vizsgáltuk.

A TRPA1 és TRPV1 relatív mRNS expressziójának meghatározása

A TRPV1 és TRPA1 ioncsatornák mRNS-ének mennyiségi meghatározását qPCR módszerrel végeztük el. Az RNA Later-ben tárolt uterus és gócmintákban található RNS izolálását Direct-zol™ RNA Miniprep (Zymo Research, Irvine, CA, USA) RNS izoláló kittel végeztük a gyártó utasításainak megfelelően. Az így nyert teljes szöveti RNS-t tartalmazó mintákat ezután DNaseI (Zymo

1. táblázat: A qPCR reakció során alkalmazott primerek paraméterei. Rövidítések: TRPA1: Tranziens Receptor potenciál Ankyrin 1, TRPV1: Tranziens receptor Potenciál Vanilloid 1, Ppia: peptidil-prolil izomeráz-A

Gén neve	Primer szekvencia	GenBank azonosító
Trpv1	sense: 5'-AATACACCATCGCTCTGCT-3'	NM_031982.1
	antisense: 5'-CAATGTGCAGTGCTGTCTGG-3'	
Trpa1	sense: 5'-AGTGGCAATGTGGAGCGATA-3'	NM_207608.1
	antisense: 5'-TCCCGTCGATCTCAGCAATG-3'	
Ppia	sense: 5'-GCAGACAAAGTTCCAAAGACAG-3'	NM_017101.1
	antisense: 5'-CCATTATGGCGTGTGAAGTC-3'

3. ábra. A Trpa1 receptor mRNA expressziója patkány endometriosis modellben a riboszomális fehérje L29 (RPL29) (A) és humán mélyen infiltráló endometriosisban (B, forrás: (25)) az Rpl29 referencia génekhez viszonyítva (átlag $\pm$ SEM, egyutas ANOVA Bonferroni poszt-teszt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$).

Research, Irvine, California USA) emésztésnek vetettük alá, a mintában lévő genomiális DNS degradálása céljából. A cDNS szintézist mintaként 1 μ g RNS-ből oligo d(T)18 primer segítségével reverz transzkripció során végeztük, *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit* (humán minták, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) és *Revert Aid First strand cDNA Synthesis Kit* (patkány minták, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) felhasználásával. A cDNS mintákból a Trpv1 és Trpa1 gének relatív expresszióját Stratagene MxP-3000 (Agilent Technologies, Santa Clara, Ca., USA) qPCR készülékkel határoztuk meg. Referencia génként humán minták esetében riboszomális protein L29-et (Rpl29), patkány mintákon peptidil-prolil izomeráz A-t (Ppia) használtunk (23). A mérés során végrehajtott disszociációs görbe analízis az amplifikációs reakció specifikusságát igazolta.

A munkánk során alkalmazott primerek szekvenciáját az **1. táblázat** tartalmazza.

Statistikai analízis

A vizsgált gének relatív mRNA expressziójának mértékét átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg. A mért adatok statisztikai eloszlását előzetesen minden esetben Kolmogorov-Smirnov normalitás tesztel állapítottuk meg. Az mRNA expresszió meghatározása során egy utas ANOVA (Bonferroni poszt teszt) tesztet alkalmaztunk. Az endometriosis léziók tömegében és területében bekövetkező változások statisztikai értékelését Student-féle t-próbával végeztük el. Az elemzéseket GraphPad Prism™ szoftverrel (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA USA) végeztük, minden esetben * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ tekintettük szignifikánsnak.

4. ábra. „Trpv1 receptor mRNA expressziója patkány endometriosis modellben a peptidil-prolil izomeráz A (A) és humán mélyen infiltráló endometriosisban (B, forrás: (25)), a riboszomális fehérje L29 referencia génekhez viszonyítva (átlag $\pm$ SEM) egyutas ANOVA Bonferroni poszt-teszt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Előzetesen értékelt humán műtéti minták

A humán műtéti minták 28 betegből (kor: 18-45 év) származtak, akik 2013 és 2014 között álltak kórházi ellátás alatt krónikus DM vagy csökkent fertilitás (szubfertilitás) miatt. Az általunk kialakított vizsgálati csoportok felosztása a következő volt: autológ endometrium [endometriosisos betegek eutopiás endometriuma (n=7)], mélyen infiltráló endometriosis (DIE) lézióból származó ectopiás endometrium (n=15), egészséges szigmbélfal-minta (n=15), nem-endometriosis eredetű infertilitás miatt kezelt betegek endometriuma [nőgyógyászati kontroll (n=6)].

Az endometriosis súlyossága, illetve a léziók mélységének meghatározása a bélfalban hisztopatológiai elemzés segítségével történt, az „American Fertility Society Scoring” (rAFS) ajánlása alapján (24). A betegek fájdalomérzetének intenzitását numerikus skála segítségével határoztuk meg. Ennek során a betegeknek egy 0-tól 10-ig terjedő skálán kell meghatározniuk az általuk érzett fájdalom erősségét. 0: nincs fájdalom, 1-3: enyhe fájdalom, 4-6 közepesen súlyos fájdalom, 7-10: súlyos fájdalom.

A Trpa1 és Trpv1 mRNS mennyiségét kvantitatív polimeráz láncreakcióval, immunhisztokémiai vizsgálatainkat paraffinba ágyazott szövetmintákból 4 µm vastagságú metszeteken végeztük. Az alkalmazott módszerek részletes leírását a 2017-ben megjelent Bohonyi et al. eredeti közlemény tartalmazza (25).

Eredmények

A Trpa1 receptor expresszió-növekedése krónikus endometriosis patkánymodellben, az expresszió összehasonlítása a humán eredményekkel

Patkány endometriosis modellben az emberi mintákhoz hasonlóan mindkét receptor mRNS kimutatható volt mind az eutopiás endometriumban, mind a hasüregi endometriosisos léziókban (3/A ábra). A Trpa1 mRNS mennyisége hasonló volt álműtött patkányok méhnyálkahártya- és zsírszövet eredetű lézió mintáiban, tehát a műtéti feltárás önmagában nem volt hatással az ioncsatornák kifejeződésére. Az álműtött és akut endometriosis csoport eutop méhnyálkahártya mintáinak Trpa1 expressziójában nem detektáltunk szignifikáns különbséget. Krónikus endometriosisban szignifikáns különbséget mértünk az endometriosis és álműtött léziók, valamint az akut endometriosis léziók között. Humán műtéti

mintákban eutopiás endometriumban és kontroll, nem endometriosisos betegből származó endometriumban is kimutattuk a Trpa1 receptor mRNS-t, eutopiás endometriumban nem detektáltunk expressziós változást. Az endometriosis léziókban azonban – hasonlóan a patkányban tapasztaltakkal – szignifikáns, 5-szörös expresszióemelkedést mértünk (3/B ábra, (25)).

A TRPV1 receptor mRNS expressziója patkány endometriosisban, a humán eredményekkel összehasonlítva

Trpv1 receptor esetében patkány endometriosis modellben a Trpa1-hez hasonlóan a műtéti feltárás nem okozott változást az mRNS expresszióban. Krónikus endometriosis esetén szignifikáns különbséget mértünk az eutopiás endometrium és álműtött, valamint akut eutopiás endometrium között. Az endometriosis léziók estében szintén szignifikáns mRNS expresszió emelkedést detektáltunk az akut léziók és az álműtött, zsírszövet eredetű gócok (4/A ábra) mintáiban. A humán műtéti mintákban érdekes módon endometriosisos páciensek eutopiás endometrium mintáiban emelkedett Trpv1 mRNS szintet mértünk, melynek szintje azonos az endometriosis léziókban mért expresszió mértékével (4/B ábra, (25)).

5. ábra. Endometriosis léziók tömegének (A) és méretének (B) alakulása RTX előkezelt, krónikus patkány endometriosis modellben. Student t-próba (*p < 0,05).

6. ábra: A TRPA1 (A, B) és TRPV1 (C, D) immunreaktivitás mértéke humán endometriumban. A nyilak az immunpozitív területeket jelölik. Az oszlopok a metszetek szövettani pontszámait ábrázolják átlag $\pm$ SEM formájában. Statisztika: Egyutas ANOVA Bonferroni poszt-teszt, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$. Nagyítás: 10x, az inszerteken 20x. Forrás: (25)

A kémiai szenzoros denerváció (deszenzitizáció) csökkenti az endometriosis léziók tömegét

A nem előkezelt, krónikus endometriosis léziók tömege a kísérlet végén átlagosan nagyjából 47 mg volt. Ez a tömeg RTX előkezelés hatására szignifikánsan csökkent, 35 mg értékre (5. ábra). Emellett meghatároztuk az egyes krónikus léziók nagyságát, mm²-re vonatkoztatva, azonban a deszenzitizáció a léziók méretét nem befolyásolta (5. ábra).

TRPV1 és TRPA1 fehérje expressziója humán endometriosisban és fájdalomparaméterekkel való korrelációja

Egészséges endometriumban elszórt TRPA1/V1 immunpozitivitás detektálható a stromalis és epithelsejtekben (6. ábra). DIE mintákban erőteljes intracelluláris TRPA1 és TRPV1 expressziónövekedést detektáltunk mindkét kompartmentben, emellett a normál endometriumhoz hasonlóan a glandularis epitheliumban található erőteljesen festődés. Néhány ectopiás endometrium mintában a makrofágok és endothelsejtek intenzív TRPA1 és TRPV1

immunpozitivitást mutattak, míg a myentericus intramuralis ganglionok és plasmocyták esetében a TRPA1 immunreaktivitás a TRPV1-nél nagyobb mértékű volt.

A DIE-asszociált fájdalomparaméterek tekintetében erős pozitív korrelációt detektáltunk a DM súlyossága és a stromalis TRPA1 és TRPV1 immunpozitivitás emelkedése között. A dyspareunia súlyossága szintén pozitív korrelációban állt az ectopiás endometriumsejtek ($r_s=0,88$) és peritonealis makrofágok TRPV1 pozitivitásának emelkedésével. Az epithelialis TRPA1 és a stromalis TRPV1 expresszió fokozódás szignifikáns mértékben korrelált a dyschezia súlyosságával (2. táblázat).

Megbeszélés

Munkánk során endometriosis patkánymodelljében megerősítettük korábbi eredményeinket, melynek során kimutattuk, hogy a TRPA1 és TRPV1 ioncsatornák expressziója nem-neuronális struktúrákon is fokozódik endometriosisban. A TRPV1/A1-et kifejező érzőidegek

gyulladásos folyamatokat serkentő funkcióját mutatja, hogy kémiai denervációt követően az endometriosisos góccok tömege csökkent patkányban. Emberi mintákban az ioncsatornák expressziófokozódása pozitív korrelációt mutat a betegek krónikus fájdalomintenzitásával, amely a csatornák fájdalomban, gyulladásban betöltött szerepére utalhat. Az endometriosis viszonylag magas prevalenciája, a betegek rossz életminősége, fájdalma, fertilitási problémái és a terápiás kihívások miatt a betegség komplex kóreléttani mechanizmusaira és új gyógyszerfejlesztési stratégiákra irányuló kutatások fókuszba kerültek. A nemzetközi egészségügyi szervezetek ajánlásokat és egy jól menedzselhető kezelési stratégiát dolgoztak ki a bizonyítékokon alapuló orvoslás (Evidence Based Medicine) keretein belül, de ezen erőfeszítések mellett is hiányosak a betegség kialakulásával kapcsolatos információk. A terápia gyógyszeres és minimál invazív sebészeti eljárásokból épül fel. A gyógyszeres terápia célja az ösztrogén proliferatív hatásainak felfüggesztése, amely az endometriosis gócai számára növekedési szignálként van jelen. Az ovuláció teljes gátlása terápiás megoldást kínál a kórkép ováriumokat is érintő megjelenési formájában. A gyógyszeres terápia történhet kombinált fogamzásgátló készí-

ményekkel, egykomponensű, csak gesztagént tartalmazó gyógyszerekkel (minipill), illetve GnRH analógok felhasználásával. Ebben a terápiás eljárásban elérhető a hypothalamo-hypophysis-gonád tengely teljes leállítása, kiküszöbölve ezzel az ösztrogén produkciót és az ovulációt. A sebészeti eljárások alkalmazásával lehetőség nyílik a primer diagnózis megerősítésére és a már meglévő gyulladásos összenövések, a méh ligamentum rendszerének illetve malformációinak korrekciójára.

A TRPV1/TRPA1 receptorokat expresszáló afferens idegvégződés nemcsak érző/fájdalomérző funkciókkal rendelkeznek, hanem vazóaktív, gyulladásokeltető és gyulladásgátló neuropeptidek is felszabadulnak belőlük az innerváció területén (26). Ezek az ioncsatornák az uterusban is kifejeződnek nem-neuronális sejteken (15, 16), egyidejű vizsgálatukat akut- és krónikus gyulladásban betöltött szerepük, gyakori lokalizációjuk és interakcióik indokolják (8). Az ösztrogén-indukált TRPA1 és TRPV1 expressziónövekedés arra utalhat, hogy szerepet játszhatnak a normális endometrium funkcióiban a reprodukciós ciklus során és kóros körülmények között a krónikus kismencedei fájdalom és a gyulladás kialakításában is (11, 29–31). Vizsgálataink során emelkedett TRPA1 és

2. táblázat: A TRPV1 (A) és TRPA1 (B) immunopozitivitás korrelációanalízise rectosigmoid endometriosis-asszociált fájdalomparaméterekkel. A TRPA1 és TRPV1 immunopozitivitás mértékét szövettani pontozási rendszerrel, az endometriosis által kiváltott fájdalommentitások súlyosságát numerikus fájdalomskálával határoztuk meg. A párosított paraméterek korrelációs együtthatóját Kolmogorov-Smirnov normalitástesztet követően a parametrikus Pearson (# dysmenorrhea és dyschezia) vagy a nem parametrikus Spearman (dysuria, dyspareunia, IBS, interstitialis cystitis) teszttel számítottuk ki. IBS: Irritábilis bél szindróma. Forrás: (25)

A	Stroma		Epithelium		Makrofág		Endothelium	
	r	p	r	p	r	p	r	p
<i>Dysmenorrhea</i> [#]	0,96	**	0,56	ns	0,56	ns	0,49	ns
<i>Dyschezia</i> [#]	0,88	*	0,71	ns	0,61	ns	0,41	ns
<i>Dysuria</i>	-0,19	ns	-0,3	ns	0,43	ns	-0,08	ns
<i>Dyspareunia</i>	0,64	ns	0,88	*	0,89	*	0,03	ns
IBS	0,82	ns	0,80	ns	0,21	ns	0,21	ns
Intersticiális cisztitisz	0,00	ns	-0,1	ns	0,53	ns	-0,21	ns

B	Stroma		Epithelium		Makrofág		Endothelium	
	r	p	r	p	r	p	r	p
<i>Dysmenorrhea</i> [#]	0,85	*	0,77	ns	0,44	ns	0,47	ns
<i>Dyschezia</i> [#]	0,72	ns	0,82	*	0,54	ns	0,41	ns
<i>Dysuria</i>	0,30	ns	0,42	ns	-0,67	ns	-0,21	ns
<i>Dyspareunia</i>	0,56	ns	0,42	ns	0,22	ns	-0,1	ns
IBS	0,80	ns	0,43	ns	0,71	ns	0,33	ns
Intersticiális cisztitisz	-0,1	ns	0,45	ns	-0,71	ns	-0,33	ns

TRPV1 mRNS expressziót figyeltünk meg patkány endometriosis léziókban, mely összhangban áll az irodalmi adatokkal, illetve saját korábbi eredményeinkkel, melynek során a TRPA1/V1 expresszió lokális emelkedését figyeltük meg DIE léziókban (12, 25,27,31). Egyre több adat támasztja alá azt a hipotézist, mely szerint a TRPV1 expresszáló idegvégződések kulcsszerepet töltenek be az endometriosisal összefüggő alhasi fájdalom kialakulásában. Peritonealis endometriosisban a TRPV1 és TRPA1 receptorokat a gyulladásos peritonealis környezetben termelődő mediátorok izgathatják, így fokozzák a krónikus fájdalom létrejöttét (32). A nem-neurális TRPV1 receptort a neurálisnál alacsonyabb aktivációs küszöb jellemzi, farmakológiai aktivációja hatására a sejtekből NO és IL-1 β felszabadulás következik be, valamint a proinflammatorikus kaszkád aktivációjának eredményeképpen a receptor szenzitizációja is bekövetkezhet, amely gyulladásos kaszkádot indít el, illetve tart fenn (10, 33). A kialakuló hosszantartó perifériás szenzitizáció olyan központi idegrendszeri változásokhoz vezet, amely magyarázatul szolgál a betegek körében tapasztalható egyénenként is eltérő fájdalomérzet változatosságára, az endometriosis típusától és súlyosságától függetlenül (34).

Jelen kísérleteinkben kimutattuk, hogy az endometriosis modellben, álműtét után a hegyszövetben (önmagában a laparotomia) és a betegségmodell akut fázisában a korai endometriosisos gócban nem változott a TRPA1 és TRPV1 mRNS expressziója. Krónikus endometriosisos szövetmintában mindkét receptor esetében szignifikáns növekedést tapasztaltunk a hegyszövettel, sőt a TRPA1 esetében az akut góccal összehasonlítva is, amely a mélyen infiltráló endometriosisos klinikai eredményeinkkel összhangba hozható (25). Mivel a TRPA1/V1-expresszáló idegek funkciókiesése után az endometriosisos gócok tömege kisebb, valószínűsíthetjük az aktiváció során belőlük felszabaduló ödéma- és gyulladás-keltő neuropeptid (pl. P-anyag, kalcitonin gén-rokon peptid: CGRP) és ezek következtében termelődő proinflammatorikus hatású citokinek (pl. IL-1) patogenetikai szerepét. Az IL-1-nek az endometrium proliferatív és reparációs, valamint gyulladásos folyamatainak szabályozásában betöltött funkcióira vannak irodalmi adatok (17,23). Emelkedett ösztrogénszint hatására továbbá a TRPV1 receptor expressziónövekedése, illetve stimulációja következik be, amely hiperalgesziához vezet (35,36).

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy az endometriosis léziókban lokálisan TRPA1 és TRPV1 expresszióemelkedés következik be, részben a nem-szenzoros

struktúrákon, amely neurogén komponenseket is tartalmazó gyulladás és perzisztáló fájdalom kialakulásához vezethet. A TRPA1 receptor szerepe bizonyított a visceralis fájdalom közvetítésében, jelenleg klinikai vizsgálat és fejlesztés alatt áll több olyan TRPA1 antagonistá vegyület, amelyek a gyulladásos, neuropátiás, és visceralis eredetű kórképekben jelenthetnek megoldást (37,38).

Rövidítések jegyzéke

CGRP: kalcitonin gén rokon peptid

DAB: diamino-benzidin

DIE: mélyen infiltráló endometriosis, deep infiltrating endometriosis

DNase I: dezoxiribonukleáz I

DM: dysmenorrhea

GnRH: gonadotropin-releasing hormon

IBS: irritábilis bél szindróma

IL-1: interleukin-1

mRNS. messenger RNS

NO: nitrogén-monoxid

NOS: nitrogén-monoxid szintetáz

PGE2: prosztaglandin E2

Ppia: peptidil-prolil izomeráz-A

qPCR: kvantitatív polimeráz láncreakció, quantitative polymerase chain reaction

rAFS: American Fertility Society Scoring

RPL29: riboszómális peptid L29

RTX: reziniferatoxin

TNF α : tumor nekrosis faktor α

TRPA1: tranziens receptor potenciál ankyrin 1

TRPV1: tranziens receptor potenciál vanilloid

Irodalom

1. Different types of extragenital endometriosis: A review AU - Bergqvist, A. Gynecol Endocrinol [Internet]. 1993 Jan 1;7(3):207–21. Available from: <https://doi.org/10.3109/09513599309152504>
2. Vercellini P, Viganò P, Somigliana E, Fedele L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. Nat Rev Endocrinol [Internet]. 2013 Dec 24;10:261. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.255>
3. Wee-Stekly W-W, Kew CCY, Chern BSM. Endometriosis: A review of the diagnosis and pain management. Gynecol Minim Invasive Ther. 2015;4(4):106–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213307015001124>
4. Jenkins TR, Liu CY, White J. Does Response to Hormonal Therapy Predict Presence or Absence of Endometriosis ? J Minim Invasive Gynecol. 2018;5(1):82–6.

5. Jones KD, Haines P, Sutton CJ. Long-term follow-up of a controlled trial of laser laparoscopy for pelvic pain. *JLS J Soc Laparoendosc Surg* [Internet]. 2001;5(2):111–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11394422>
6. Venkatachalam K., C. M. TRP Channels. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 2007;76:387–417. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4196875/>
7. Baraldi P. G., Preti D., Materazzi S., Geppetti P. Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) Channel as Emerging Target for Novel Analgesics and Anti-Inflammatory Agents. *J Med Chem* [Internet]. 2010;53(14):5085–107. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/jm100062h>
8. Fernandes E. S., Fernandes M. A., Keeble J. E. The functions of TRPA1 and TRPV1: Moving away from sensory nerves. *Br J Pharmacol*. 2012;166(2):510–21.
9. Caterina M. J., Schumacher M. A., Tominaga M., Rosen T. A., D. L.J., Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997;389(6653):816–24.
10. Rocha MG, Silva JCR e, Ribeiro da Silva A, Candido Dos Reis FJ, Nogueira AA, Poli-Neto OB. TRPV1 Expression on Peritoneal Endometriosis Foci is Associated With Chronic Pelvic Pain. *Reprod Sci* [Internet]. 2011 Jun 1;18(6):511–5. Available from: <http://rsx.sagepub.com/content/18/6/511.abstract>
11. Liu J, Liu X, Duan K, Zhang Y, Guo S-W. The Expression and Functionality of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 in Ovarian Endometriomas. *Reprod Sci* [Internet]. 2012 Oct 1;19(10):1110–24. Available from: <http://rsx.sagepub.com/content/19/10/1110.abstract>
12. Kark T., Bagi Zs., Lizanecz E., Pásztor E. T., Erdei N., Czikora Á., et al. Tissue-specific regulation of microvascular diameter: opposite functional roles of neuronal and smooth muscle located vanilloid receptor-1. *Mol Pharmacol*. 2008;73(5):1405–12.
13. Greaves E., Grieve K., Horne A. W., Saunders P. T. Elevated peritoneal expression and estrogen regulation of nociceptive ion channels in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(July):jc20142282. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25029427>
14. McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2007 Aug 14;104(33):13525–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1941642/>
15. Telfer J. F., Irvine G. A., Kohonen G., Campbell S., Cameron I. T. Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in non-pregnant and decidualized human endometrium. *Mol Hum Reprod*. 1997;3(1):69–75. Available from: <http://molehr.oxfordjournals.org/content/3/1/69.abstract>
16. Mizuno K., Tanaka T., Umesaki N., Ogita S. Inhibition of cAMP-mediated decidualization in human endometrial stromal cells by IL-1 β and laminin. *Horm Metab Res = Horm und Stoffwechselforsch = Horm métabolisme*. 1999;31(5):307–10.
17. Wira C. R., Fahey J. V., Ghosh M., Patel M. V., Hickey D. K., Ochiel D. O. Sex Hormone Regulation of Innate Immunity in the Female Reproductive Tract: The Role of Epithelial Cells in Balancing Reproductive Potential with Protection against Sexually Transmitted Pathogens. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(6):10.1111/j.1600-0897.2010.00842.x. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3837356/>
18. Szállási A., Szolcsányi J., Szállási Z., Blumberg PM: Inhibition of [3H] resiniferatoxin binding to rat dorsal root ganglion m ... compounds with capsaicin-like activity . *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1991;344(5):172–81.
19. Pelch KE, Sharpe-Timms KL, Nagel SC. Mouse model of surgically-induced endometriosis by auto-transplantation of uterine tissue. *J Vis Exp* [Internet]. 2012 Jan 6;(59):e3396–e3396. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22257948>
20. Ohtori S, Chiba T, Takahashi K, Ino H, Yamagata M, Sameda H, et al. Neonatal capsaicin treatment decreased substance P receptor immunoreactivity in lamina III neurons of the dorsal horn. *Neurosci Res*. 2000;38(2):147–54.
21. Vyklícký L, Benedikt J, Samad A, Touška F, Vlachová V. Calcium-Dependent Desensitization of Vanilloid Receptor TRPV1: A Mechanism Possibly Involved in Analgesia Induced by Topical Application of Capsaicin. 2008;57.
22. Borbely E, Botz B, Bolcskei K, Kenyer T, Kereskai L, Kiss T, et al. Capsaicin-sensitive sensory nerves exert complex regulatory functions in the serum-transfer mouse model of autoimmune arthritis. *Brain Behav Immun*. 2015 Mar;45:50–9.
23. Pohóczky K, Kun J, Szalontai B, Szőke É, Sággy É, Payrits M, et al. Estrogen-dependent up-regulation of TRPA1 and TRPV1 receptor proteins in the rat endometrium. *J Mol Endocrinol*. 2016 Feb 1;56(2):135–49. Available from: <http://jme.endocrinology-journals.org/content/56/2/135.abstract>
24. Hornstein MD, Gleason RE, Orav J, Haas ST, Friedman AJ, Rein MS, et al. The reproducibility of the revised American Fertility Society classification of endometriosis *. *Fertil Steril*. 2016 Jul 5;99(5):1015–21. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)55921-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(16)55921-4)
25. Bohonyi N, Pohóczky K, Szalontai B, Perkecz A, Kovács K, Kajtár B, et al. Local upregulation of transient receptor potential ankyrin 1 and transient receptor potential vanilloid 1 ion channels in rectosigmoid deep infiltrating endometriosis. *Mol Pain*. 2017 May 7;13:1744806917705564–1744806917705564. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28478727>
26. Szolcsányi J., Pintér E., Helyes Zs., Oroszi G., Németh J. Systemic anti-inflammatory effect induced by counter-irritation through a local release of somatostatin from nociceptors. *Br J Pharmacol*. 1998;125(4):916–22.
27. Liu J., Liu X., Duan K., Zhang Y., Guo S.-W. The Expression and Functionality of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 in Ovarian Endometriomas. *Reprod Sci*. 2012;19(10):1110–24.
28. Rocha MG, Gomes VA, Tanus-Santos JE, Rosa-e-Silva JC, Candido-dos-Reis FJ, Nogueira AA, et al. Reduction of blood nitric oxide levels is associated with clinical improvement of the chronic pelvic pain related to endometriosis . *Vol. 48, Brazilian Journal of Medical and Biological Research . scielo* ; 2015. p. 363–9.
29. Suzuki M., Sugimoto H., Nakagawa A., Tanaka I., Nishihira J., Sakai M. Crystal structure of the macrophage migration inhibitory factor from rat liver. *Nat Struct Mol Biol*. 1996;3(3):259–66.
30. Akoum A., Metz C. N., Al-Akoum M., Kats R. Macrophage migration inhibitory factor expression in the intrauterine endometrium of women with endometriosis varies with disease stage, infertility status, and pelvic pain. *Fertil Steril*. 2006;85(5):1379–85. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028206002263>

31. Greaves E, Temp J, Esnal-Zufiurre A, Mechsner S, Horne AW, Saunders PTK. Estradiol Is a Critical Mediator of Macrophage-Nerve Cross Talk in Peritoneal Endometriosis. *Am J Pathol*. 2015 Aug 16;185(8):2286–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4530129/>
32. Goff AK. Steroid Hormone Modulation of Prostaglandin Secretion in the Ruminant Endometrium During the Estrous Cycle1. *Biol Reprod* [Internet]. 2004 Jul 1;71(1):11–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.103.025890>
33. Poli-Neto O. B., Adnor Filho A., e Silva J. C. R., de Freitas Barbosa H., Dos Reis F. J. C., Nogueira A. A. Increased capsaicin receptor TRPV1 in the peritoneum of women with chronic pelvic pain. *Clin J Pain*. 2009;25(3):218–22.
34. Arnold J., Vercellino G. F., Chiantera V., Schneider A., Mechsner S., Barcena de Arellano M. L. Neuroimmunomodulatory Alterations in Non-Lesional Peritoneum Close to Peritoneal Endometriosis. *Neuroimmunomodulation* [Internet]. 2013;20(1):9–18. Available from: <http://www.karger.com/DOI/10.1159/000342163>
35. Rossi F, Bellini G., Torella M., Tortora C., Manzo I., Giordano C., et al. The genetic ablation or pharmacological inhibition of TRPV1 signalling is beneficial for the restoration of quiescent osteoclast activity in ovariectomized mice. *Br J Pharmacol*. 2014;171(10):2621–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4009004/>
36. Idris A. I., Landao-Bassonga E., Ralston S. H. The TRPV1 ion channel antagonist capsazepine inhibits osteoclast and osteoblast differentiation in vitro and ovariectomy induced bone loss in vivo. *Bone*. 2016;46(4):1089–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2010.01.368>
37. Holzer P. TRP channels in the digestive system. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011 Jan 1;12(1):24–34. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20932260>
38. Cattaruzza F, Spreadbury I, Miranda-Morales M, Grady EF, Vanner S, Bunnett NW. Transient receptor potential ankyrin-1 has a major role in mediating visceral pain in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009/10/29. 2010 Jan;298(1):G81–91. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19875705>