

**A tranziens receptor potenciál ankyrin 1 és vanilloid 1 receptorok és a
szemikarbazid-szenzitív amin oxidáz szerepe és kapcsolata
ízületi gyulladás és fájdalom egérmodelljeiben**

Doktori (PhD) értekezés tézisei



Dr. Horváth Ádám István

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Neurofarmakológia Program

Doktori Iskola vezetője, Programvezető: Prof. Dr. Pintér Erika

Témavezető: Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Pécs

2017

BEVEZETÉS

1. A tranziens receptor potenciál ankyrin 1 (TRPA1) és vanilloid 1 (TRPV1) receptorok

A TRPA1 és TRPV1 ioncsatornához kötött receptorok, amelyek a vékony mielinhüvelyes (A δ) és a mielinhüvely nélküli (C-) érző rostokkal rendelkező neuronok sejttestein és végződésein kívül a hátsó gyöki és trigeminus ganglionokban [1,2], illetve nem neurális sejteken is funkcionálisan expresszálódnak [3]. A receptorok polimodális szenzor funkcióval rendelkeznek, hiszen kémiai irritánsok, endogén mediátorok és fizikai ingerek is képesek stimulálni. A TRPA1-et többek között táplálékban is megtalálható csípős vegyületek (pl. allil-izotiocianát, allicin, fahéjaldehid, mentol), reaktív oxigén gyökök (ROS), szemikarbazid-szenzitív amin oxidáz (SSAO) termékek (pl. formaldehid, metilglioxál, hidrogén-peroxid) és az alacsony hőmérséklet (<17°C), a TRPV1-et növényi eredetű vanilloidok (pl. kapszaicin, reziniferatoxin, piperin, zingeron, eugenol), protonok (pH<6), arachidonsav metabolitok (pl. anandamid, 12-hidroperoxi-eikozatetraénsav: 12-HPETE, N-oleoildopamin) és a fájdalmas hőinger (>43°C) aktiválja [3,4]. Emellett még számos proinflammatorikus mediátor (pl. bradikinin, prosztaglandinok, proteázok, szerotonin) is szenzitiválja a receptorokat [5,6].

A TRPA1 és TRPV1 receptorokat expresszáló érzőideg végződések a polimodális nociceptorok egy sajátos alcsoportját képezik. Ezek az ún. peptiderg, kapszaicin-érzékeny érzőideg végződések, amelyek az A δ - és a C-rostok 40-50%-át teszik ki [7]. Különlegességük, hogy egyedülálló módon hármas funkcióval rendelkeznek. Az afferens működés során részt vesznek a fájdalom inger érzékelésében és továbbításában, a lokális efferens funkció révén neurogén gyulladást hoznak létre gyulladáskeltő neuropeptidek felszabadulását (pl. kalcitonin gén-rokon peptid: CGRP, P-anyag: SP, neurokinin A és B: NKA, NKB) követően, a szisztémás efferens funkció következtében pedig szisztémás hatásokkal rendelkező gyulladásgátló és fájdalomcsillapító neuropeptidek kerülnek a keringésbe (pl. szomatosztatin) [8,9]. A neurogén gyulladás számos gyulladásos betegségben játszik fontos szerepet (pl. reumatoid artritisz, asztma, pszoriázis, ekcéma, kontakt dermatitisz, migrén, gyulladásos bélbetegségek), azonban jelenleg egyetlen gyógyszercsoport sem áll rendelkezésünkre, amely hatékonyan gátolná az említett betegségeknek ezt a komponensét [10]. Ezért óriási szükség van patomechanizmusuk alaposabb megértésére és új terápiás célpontok azonosítására. Ilyen új, potenciális gyógyszer támadáspontok lehetnek a TRPA1 és TRPV1 receptorok is.

2. A szemikarbazid-szenzitív amin oxidáz (SSAO) szerepe gyulladásban és fájdalomban, kapcsolata TRPA1 és TRPV1 receptorokkal

Az SSAO vagy más néven vaszkuláris adhéziós protein-1 (VAP-1) az amin oxidázok családjába tartozó réztartalmú enzim, ami a primér aminok oxidatív dezaminációját végzi a szervezetben. A reakció során megfelelő aldehid, hidrogén-peroxid és ammónia keletkezik [11]. A szervezetben plazmában oldott vagy membránhoz kötött formában fordul elő, széles körű szöveti eloszlást mutat, azonban elsősorban az endotél sejtekben, a vaszkuláris simaizomban és az adipocitákban expresszálódik [12]. Az endogén (pl. metilamin, aminoaceton) és exogén (pl. allilamin) aminok lebontása mellett szerepe van a leukocita adhézióban és extravazációban, illetve az angiogenezisben is [13,14]. Ezzel magyarázható, hogy számos gyulladással komponenssel is rendelkező patofiziológiai állapotban (pl. gyulladással máj-, izom- és szembetegségekben, cukorbetegségben, pangásos szívelégtelenségben, ateroszklerózisban, strokeban, elhízásban, krónikus vesebetegségben, pszoriázisban, szklerózis multiplexben, Alzheimer-kórban) detektáltak szignifikánsan emelkedett SSAO aktivitást, ami felveti biomarkerként való alkalmazhatóságát ezekben a kórképekben [15]. Számos kis molekulájú SSAO-inhibitorral és anti-SSAO antitesttel végzett tanulmány igazolta, hogy az SSAO-gátlóknak gyulladást és érújdonképződést csökkentő hatásuk miatt terápiás értéke is lehet [16-20]. Kutatócsoportunk emellett felvetette potenciális fájdalomcsillapító hatásukat is, amelyet az endogén és exogén aminok lebontása során képződött ismert TRPA1 aktivátorok (hidrogén-peroxid, formaldehid, metilglioxál, akrolein) csökkent termelődésére alapoztunk.

Számos kis molekulájú, elsősorban hidrazin és allilamin szerkezetű SSAO-inhibitor fejlesztettek ki az elmúlt 15 évben terápiás céllal, azonban ezek kísérleti vagy klinikai alkalmazását sok tényező, pl. nem megfelelő szelektivitás vagy kedvezőtlen fizikokémiai tulajdonságok megakadályozták [21]. Munkacsoportunk ezzel szemben egy új oxim vegyületet szabadalmaztatott, az SzV-1287-et (3-(4,5-dipheyl-1,3-oxazol-2-yl) propanal oxim), amely az ismert ciklooxygenáz (COX)-inhibitor oxaprozin oxim analógja [22,23]. Az SzV-1287 egy innovatív, metabolizmus-aktivált több támadáspontú vegyület, amely az SSAO-gátló hatás mellett metabolitja (oxaprozin) révén COX-gátló hatással, illetve az alaphatástól függetlenül az érző neuronokon, valamint az érzőideg végződéseken TRPA1 és TRPV1-antagonista hatással is rendelkezik [24,25]. Utóbbi eredmény potenciális fájdalomcsillapító hatását támasztotta alá, amit még egyetlen SSAO-gátló vegyülettel kapcsolatban sem bizonyítottak.

3. Az ízületi gyulladás, kezelési lehetőségei és nehézségei

A gyulladásos ízületi betegségek (arthritiszek) a reumatológiai kórképek egyik legnagyobb csoportját képezik, Magyarországon kb. 130-150 ezer beteget érintenek [26]. Infekciózus és nem infekciózus kórképekre oszthatók. Utóbbiak közül gyakoriságát és súlyosságát tekintve kiemelkedik a reumatoid arthritisz (RA), amely egy ismeretlen eredetű, krónikus, progresszív, sokízületi gyulladással és destrukcióval járó szisztémás autoimmun kórkép. Világszerte a lakosság kb. 1%-át, Magyarországon 0,3-0,5%-át érinti, a nőkben háromszor gyakrabban fordul elő, leggyakrabban a negyedik-ötödik évtizedben kezdődik [27,28]. Nemcsak az életminőséget rontja jelentősen, hanem a várható élettartamot is megrövidíti 3-10 évvel, ezért jelentős népegészségügyi problémának tekinthető.

RA gyógyszeres kezelésében tüneti és oki terápiát különböztetünk meg. Tüneti szerek között szteroid és nem szteroid gyulladáscsökkentőket (NSAID), míg oki terápiaként a szintetikus és biológiai betegségmódosító szereket (disease-modifying antirheumatic drug: DMARD), illetve szintén a szteroidokat említhetjük [29]. Mindegyik szer esetén gyakran kell számolnunk hatástalansággal, a hosszú távú alkalmazás során pedig súlyos mellékhatásokkal [30-32]. Bár a biológiai szerek, közülük is elsősorban a tumor nekrozis faktor (TNF)- α gátlók a struktúrális progresszió jelentős lassításával forradalmasították RA kezelését, azonban a betegek életminőségét jelentősen rontó ízületi fájdalomra alig hatnak. Ezért óriási szükség van a patomechanizmus immunológiai aspektusa mellett az ízületet gazdagon innerváló kapszaicin-érzékeny érzőideg végződéséek által közvetített neurogén komponens, illetve a neuro-immun és neuro-vaszkuláris interakciók pontos feltérképezésére és ezáltal új terápiás célpontok azonosítására. Lokalizációjuk és funkcionális tulajdonságaik alapján új gyulladás- és fájdalomcsillapítók támadáspontjai lehetnek a TRPA1 és TRPV1 receptorok, illetve az SSAO is.

4. A neuropátiás fájdalom mechanizmusai, terápiás kihívások

A neuropátiás fájdalom a szomatoszenzoros rendszer károsodásának vagy betegségének következtében kialakuló fájdalomállapot [33]. Prevalenciáját illetően nem állnak rendelkezésünkre pontos epidemiológiai adatok, a Nyugat-Európai populációnak kb. 7-8%-át érintheti [34]. A neuropátiás fájdalmat okozó betegségek között az idegkárosodás anatómiai lokalizációja és etiológiája alapján perifériás traumás neuropátiákat, perifériás polineuropátiákat (lehet metabolikus, gyulladásos, tumoros vagy toxikus eredetű), centrális

fájdalom szindrómákat (pl. posztstroke fájdalom) és egyéb kevert komplex fájdalom szindrómákat (pl. komplex regionális fájdalom szindróma) különböztetünk meg.

Kezelése hatalmas kihívások elé állítja az orvosokat, hiszen patomechanizmusa mind a mai napig nem teljesen ismert, így célzott terápiával sem rendelkezünk. Terápiája elsősorban gyógyszeres, amely során a konvencionális fájdalomcsillapítók hatástalansága, illetve limitált hatékonysága miatt elsősorban ún. adjuváns analgetikumokat (bizonyos antiepileptikumokat, triciklikus antidepresszánsokat, helyi érzéstelenítőket, kapszaicin tapaszt) használnak [35]. A betegek felében azonban ezekkel sem sikerül megfelelő fájdalomcsökkenést elérni, míg a terápiára reagáló betegek esetében a súlyos, gyakori mellékhatások miatt nem lehet hosszútávú alkalmazásukkal számolni. Megoldatlan terápiája miatt fontos a kialakulásában szerepet játszó perifériás és centrális mechanizmusok alaposabb megértése és ezáltal új terápiás célpontok feltérképezése. Utóbbiak közé tartozhat a neuropátiás fájdalomállapotokban is fontos szerepet játszó TRPA1 receptor, illetve az endogén agonistáit termelő SSAO. Szerepüket a perifériás traumás és a krónikus ízületi gyulladás késői fázisához kapcsolódó neuropátiás fájdalom egérmódeljeiben vizsgáltuk.

CÉLKITŰZÉSEK

A neuropátiás fájdalom csillapítása jelenti az egyik legnagyobb kihívást a hétköznapi orvosi gyakorlatban, hiszen a rendelkezésre álló fájdalomcsillapító gyógyszerek általában hatástalanok, illetve hosszan tartó alkalmazás során súlyos mellékhatásokat okozhatnak. Óriási szükség lenne súlyos mellékhatásoktól mentes, új hatásmechanizmusú, hatékony fájdalomcsillapító szerek kifejlesztésére, ezért ízületi gyulladás és traumás idegsérülés egérmódeljeiben igyekeztünk a fájdalom pontos mechanizmusát és a neuro-immun interakciók szerepét feltárni, új terápiás célpontokat azonosítani, illetve egy új gyógyszerjelölt vegyület hatását és hatásmechanizmusát vizsgálni.

Munkám általános célkitűzései a következők voltak:

1. A TRPA1 és TRPV1 receptorok szerepének vizsgálata akut és krónikus ízületi gyulladás és fájdalom modelljeiben génhányos egerek segítségével.
2. Az SSAO szerepének vizsgálata szérum transzfer- és adjuváns-indukált krónikus artritisz egérmódellekben SSAO-gátló vegyületek segítségével.
3. A TRPA1, TRPV1 és az SSAO kapcsolata akut kemonocifenzív, szérum transzfer-indukált krónikus artritisz és traumás idegsérülés egérmódellekben génhányos egerek és SSAO-gátló vegyületek segítségével.

KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

1. Kísérleti állatok

Kísérleteinkben 20-30 g súlyú, 8-15 hetes hím TRPV1 (TRPV1^{-/-}) és TRPA1 génhányos (TRPA1^{-/-}) egereket, illetve vad típusú párjaikat (C57BL/6J és TRPA1^{+/+}) használtuk. Az SSAO-gátló vegyületek hatásait azonos korú, 20-30 g súlyú hím C57BL/6J és 30-40 g súlyú hím CD1 egereken vizsgáltuk. TRPV1^{-/-} egereket intézetünk homozigóta törzsként vette (The Jackson Laboratory) és tenyészt. Mivel eredeti szülőpárjait C57BL/6J törzsből származó egerekkel visszakeresztették, ezért ezt a törzset használtuk vad típusú (WT) kontrollként. A homozigóta TRPA1^{-/-} és TRPA1^{+/+} egereket a Prof. Pierangelo Geppetti (Firenzei Egyetem) által, kollaboráció keretein belül rendelkezésünkre bocsátott heterozigóta TRPA1^{+/-} egerekből származtattuk, majd külön vonalon tenyésztettük őket. Az utódok genotípusát polimeráz láncreakcióval (PCR) határoztuk meg. Az állatok tenyésztése és tartásuk a vonatkozó standardoknak megfelelően a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar (PTE ÁOK), Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetének állatházában történt. Az állatokat standard méretű (160x137x330 mm) műanyag ketrecekben (5-10 egér/ketrec), 24-25°C-on, 12-12 órás sötét-világos ciklusban tartottuk, a táplálékhoz és az ivóvízhez korlátlanul hozzáfértek.

2. Etikai vonatkozások

Minden kísérleti eljárás és vizsgálat eleget tett az állatok védelméről és kíméletéről szóló 1998. évi XXVIII. törvény és az állatkísérletek végzéséről szóló 40/2013 (II.14.) számú kormányrendelet előírásainak, illetve az Európai Parlament és Tanács 2010/63/EU irányelvének és Nemzetközi Fájdalom Társaság (IASP) ajánlásainak. A kísérleti protokollokat a PTE állatkísérletekkel foglalkozó Etikai Bizottsága engedélyezte (engedélyszám: BA02/2000-25/2011, BA 02/2000-2/2012).

3. Kísérleti modellek

3.1. CFA-indukált krónikus artritisz modell

A krónikus ízületi gyulladást CD1 egerekben 20-20, TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} egerekben 50-50 µl komplett Freund adjuváns (CFA, 1 mg/ml hővel előlt Mycobacterium tuberculosis paraffinolajos szuszpenziója, Sigma Aldrich) jobb talpba és faroktőbe való szubkután (s.c.) injekciójával váltottuk ki. A szisztémás hatás fokozása érdekében a faroktőbe adást következő napon megismételtük, ezt tekintettük a kísérlet 1. napjának [36]. A 21 napos kísérleti periódus

során mechanonociceptív küszöb, lábtérfogat, termonociceptív küszöb, hidegérzékenység, neutrofil mieloperoxidáz (MPO) aktivitás és plazmafehérje extravazáció meghatározása történt.

3.2. K/BxN szérumszintézis artritisz modell

A tranziens sokízületi gyulladást CD1 egerekben artritogén K/BxN szérumszintézis (300 µl 0. nap), C57BL/6J, TRPV1^{-/-}, TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} egerekben ismételt (150-150 µl 0. és 3. nap) intraperitoneális (i.p.) adásával váltottuk ki. A kontroll állatok nem-artritogén BxN szérumszintézist kaptak ugyanezt a paradigmát követve [37,38]. A 14, illetve 21 napos kísérleti periódus során mechanonociceptív küszöböt, lábtérfogatot, artritisz klinikai súlyosságát, ízületi funkciót, neutrofil MPO aktivitást és plazmafehérje extravazációt mértünk.

3.3. Traumás mononeuropátia modell

Az idegkárosodást nervus ischiadicus 1/3-ának részleges lekötésével váltottuk ki (Seltzer műtét) ketamin/xylazin altatásban (Calypsol/Sedaxylan, 100/5 mg/kg i.p.) C57BL/6J, TRPV1^{-/-}, TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} egerekben [39,40]. Posztoperatív 7. napon mechanikai fájdalomküszöb mérést végeztünk.

3.4. Karragenin-indukált akut gyulladás modell

Az akut gyulladást 50 µl 3%-os karragenin-oldat (Sigma Aldrich) intraplantáris (i.pl.) adásával váltottuk ki TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} egerekben. A kontrollként szolgáló ellenoldali talpba karrageninnel megegyező volumenű 0,9%-os fiziológiás sóoldatot injektáltunk [41]. A 24 órás kísérleti periódus során mechanonociceptív és termonociceptív küszöb, lábtérfogat és hidegérzékenység meghatározása történt.

3.5. CFA-indukált akut gyulladás modell

Akut ízületi gyulladást 20 µl CFA (Sigma Aldrich) jobb térdízületbe való injekciójával váltottuk ki TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} egerekben, a kontrollként szolgáló bal térdízületbe CFA-val megegyező volumenű 0,9%-os fiziológiás sóoldatot injektáltunk [42]. A 24 órás kísérleti periódus során mechanonociceptív küszöb és térdátmérő meghatározása történt.

3.6. Akut kemonocifenzív modellek

3.6.1. TRPV1 aktiváció-indukált akut termális és mechanikai hiperalgémia modell

A kapszaicin-érzékeny érzőideg végződések direkt aktivációját az ultrapotens, szelektív TRPV1 agonista reziniferatoxin (RTX, Sigma Aldrich; 20 µl, 0,03 µg/ml) jobb talpba való injektálásával váltottuk ki C57BL/6J egerekben. Az RTX injekció után 10 perccel 20 percen keresztül 5 perces időközönként termonociceptív küszöböt, 2, 4, 6 és 24 óránál pedig mechanonociceptív küszöböt detektáltunk [43].

3.6.2. TRPA1 aktiváció-indukált akut nocifenzív reakció és mechanikai hiperalgéria modell

A TRPA1-et is expresszálo érzőideg végződészek direkt aktivációját TRPA1 agonista formalin (20 µl, 2,5%) jobb talpba való injekciójával váltottuk ki C57BL/6J egerekben. Formalin-adást követően az elhárító reakció időtartamát 2 fázisban mértük, 0-5 perc között a formalin direkt kemonociceptív hatását, míg 20-45 perc között a formalin-indukált gyulladásoo reakciót detektáltuk. 2 és 4 óránál mechanonociceptív küszöb mérés történt [41].

4. Farmakológiai módszerek

4.1. SzV-1287 és LJP-1207 kezelés

CFA-indukált és K/BxN szérum-transzfer artritisz modellben SzV-1287-et és a referencia SSAO-gátló LJP-1207-et (N'(2-fenil-allil)-hidrazin hidroklorid) naponta i.p. 20 mg/kg dózisban, traumás mononeuropátia modellben SzV-1287-et egyszeri 20 perces előkezelésként i.p. 2, 5, 10 és 20 mg/kg dózisban, tartós előkezelésként i.p. 20 mg/kg dózisban, LJP-1207-et egyszeri 20 perces előkezelésként i.p. 20 mg/kg dózisban alkalmaztuk. Akut neurogén gyulladás modellekben a vegyületeket az RTX- és formalin injekció előtt 20 perccel alkalmaztuk i.p. 20 mg/kg-os dózisban. LJP-1207-et desztillált vízben, SzV-1287-et kezdetben 2% Tween 80-at (polietilén-glikol-szorbitán-monooleát), 2% etanolt és 96% desztillált vizet, később 20% Kolliphor HS 15-öt (polietilén-glikol-15-hidroxiszteraaát) és 80% desztillált vizet tartalmazó oldószerben oldottuk. A 2 mg/ml koncentrációjú oldatokat minden alkalommal frissen, közvetlenül a beadás előtt készítettük. Kontrollként minden esetben a megfelelő oldószerrel kezelt állatok szolgáltak.

4.2. Oxaprozin és diklofenák kezelés

Traumás mononeuropátia modellben az SzV-1287 metabolit oxaprozin és a nem szteroid gyulladásgátló diklofenák SzV-1287 referencia vegyületeiként szolgáltak. SzV-1287-hez hasonlóan a vegyületeket egyszeri 20 perces előkezelésként i.p. 20 mg/kg-os dózisban alkalmaztuk C57BL/6J egerekben.

5. Vizsgálati módszerek

5.1. Mechanonociceptív küszöbmérés

A mechanonociceptív küszöböt a hátsó lábakon dinamikus plantáris eszteziométerrel (DPA, Ugo Basile 37400) határoztuk meg. A mechanikai fájdalomküszöb csökkenés (hiperalgéria) mértékét a kísérlet előtt mért kontrollértékekhez viszonyítva, százalékban adtuk meg [36].

5.2. Lábtérfogat mérés

A lábtérfogat mérését a közlekedőedények elve alapján működő pletizmométerrel végeztük (Ugo Basile Plethysmometer 7140). A lábtérfogat változás mértékét a kísérlet előtt mért kontrollértékekhez viszonyítva, százalékban adtuk meg [36].

5.3. Térdátmérő mérés

A térdék anteroposterior és mediolaterális átmérőit digitális mikrométerrel (Mitutoyo Corporation) határoztuk meg. A térdátmérő változás mértékét a kísérlet előtt mért kontrollértékekhez viszonyítva, százalékban adtuk meg [44].

5.4. Termonociceptív küszöbmérés

A termonociceptív küszöböt a hátsó lábón emelkedő hőmérsékletű forró lappal (IITC Life Science Woodland Hills) határoztuk meg. A termális hiperalgécia mértékét a kísérlet előtt mért kontrollértékekhez viszonyítva, °C-ban adtuk meg [43].

5.5. Hidegérzékenység meghatározása

A hidegérzékenységet a hátsó lábak 0°C-os jeges vízfürdőbe merítését követően az elhárító reakció latenciaidejének mérésével határoztuk meg. Az elhárító reakció latencia idejét a kísérlet előtt mért kontrollértékekhez viszonyítva, másodpercben adtuk meg [45].

5.6. Ízületi gyulladás súlyosságának meghatározása

Az ízületi gyulladás súlyosságát K/BxN szérum-transzfer artritisz modellben naponta szemikvantitatív pontozással határoztuk meg egy 0-tól 10-ig tartó skála segítségével az ödéma és a pirosság mértéke alapján [37].

5.7. Ízületi funkció megítélése

Az állatok ízületi funkcióját jelző kapaszkodási képességet ún. grid teszttel határoztuk meg K/BxN szérum-transzfer artritisz modellben. Az állatok rácson töltött idejét egy fejjel lefelé fordított vízszintes rácson detektáltuk 20 másodperces maximális idővel. A vizsgálat során mért eredményeket a kísérlet előtt mért kontrollértékekkel összehasonlítva meghatározhattuk az ízületi funkcióromlás mértékét [37].

5.8. *In vivo* neutrofil MPO aktivitás és plazmafehérje extravazáció mérés

Az artritisz patomechanizmusában fontos szerepet betöltő neutrofil MPO aktivitását lumineszcens, a plazmafehérje extravazáció mértékét fluoreszcens *in vivo* képalkotással, IVIS Lumina II (PerkinElmer) készülék segítségével vizsgáltuk [46].

5.9. Szövetteni vizsgálat

CFA-indukált artritisz modellben nátrium-pentobarbitállal (Euthanimal 100 mg/kg i.p.) történő túlaltatást követően 10. napon TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-}, 21. napon CD1 egerek tibiotarzális ízületeit távolítottuk el szövetteni feldolgozás céljából. A metszeteket hematoxilin-eozinnal

festettük, majd előre meghatározott paraméterek alapján pontoztuk. Az értékelés végén az egyes paraméterekhez tartozó pontszámokat összeadtuk, így az egyes metszetekhez, és ezáltal az egyes állatcsoportokhoz tartozó összetett artritisz pontszámot kaptunk [36].

5.10. Gyulladásos citokin koncentráció meghatározása

CFA-indukált és K/BxN szérumszintézis artritisz modellben mély nátrium-pentobarbitál (Euthanival, 100 mg/kg i.p.) altatásban a 4. napon CD1 egerektől szív punkcióval vérmintát vettünk, illetve a tibiotarzális ízületeiket kimetszettük citokin koncentráció meghatározása céljából. A vérminták centrifugálását és az ízületek homogenizálását követően interleukin (IL)-1 β , IL-6, keratinocita kemoattraktáns (KC), makrofág gyulladásos protein-2 (MIP-2) és TNF- α koncentrációját Luminex Multiplex Immunoassay módszerrel határoztuk meg, Milliplex Egér Citokin/Kemokin Mágneses Gyöngy Panel (Merck Millipore) felhasználásával [47]. Az eredményeket az ízületi homogenizátumok esetén szövetsúlyra vonatkoztatva, pg/mg-ban, a vérplazmák esetén pg/ml-ben fejeztük ki.

5.11. Sejttenyésztés és a porcképződés mértékének fénymikroszkópos detektálása

A porcosodó „micromass” mezenchimális sejt kultúrákat 10 μ M SzV-1287-tel és LJP-1207-tel kezeltük 6. és 8. tenyésztési naptól kezdve. Kontrollként az oldószerrel kezelt sejt kultúrák szolgáltak. 10. tenyésztési napon a 0,1%-os dimetilmetilénkékkel metakromáziásan festődő porcmátrix mennyiségét 0,1%-os toluidinkék (TK) festést követően microplate leolvasó (Chameleon, Hidex Kft.) segítségével határoztuk meg [48].

5.12. Statisztikai analízis

A mechanikai hiperalgázia (kivéve a traumás mononeuropátia modellben), a láb- és térd ízületi duzzadás, a termális hiperalgázia, a hidegérzékenység, az artritisz súlyossági pontszám és az ízületi funkcióvesztés esetén Bonferroni módosított posztteszttel kiegészített két utas variancia analízist (ANOVA), a neuropátias hiperalgázia, az *in vivo* optikai képalkotás, a citokin koncentráció mérés és a szövettani szemikvantitatív pontszámok esetén Bonferroni módosított posztteszttel kiegészített egy utas ANOVA-t, a formalin-indukált elhárító reakció és a TK-val festett porcmátrix mennyiségének szemikvantitatív értékelése esetén Student-féle kétmintás t-tesztet alkalmaztunk. Az eredmények összehasonlításakor azokat a változásokat tekintettük szignifikánsnak, ahol $p < 0,05$ volt.

EREDMÉNYEK

1. A TRPA1 és TRPV1 receptorok szerepe ízületi gyulladás és fájdalom egérmodelljeiben

1.1. A CFA-indukált mechanikai hiperalgémia és lábduzzadás kisebb TRPA1 receptor hiánya esetén

TRPA1^{+/+} egerekben jelentős mechanikai hiperalgémia és lábduzzadás alakult ki a CFA adását követően, ami 3. (65%) és 14. napon (83%) érte el maximumát. TRPA1^{-/-} csoportban a mechanikai hiperalgémia a 2., az ödéma már az 1. naptól kezdve szignifikánsan kisebb volt a vad csoporthoz képest. Termális hiperalgémia egyik csoportban sem volt megfigyelhető, míg a hidegtolerancia mindkét egértörzsben hasonló mértékben csökkent a kísérlet során a gyulladástól függetlenül.

1.2. CFA-indukált artritisz korai fázisában a neutrofil MPO aktivitás, késői fázisában a plazmafehérje kiáramlás kisebb TRPA1^{-/-} csoportban

CFA-indukált artritisz korai fázisában (2. napon) a neutrofil MPO aktivitást indirekt jelző luminol adását követően a TRPA1^{+/+} és a TRPA1^{-/-} csoportban is jelentős aktivitás fokozódást tapasztaltunk az artritiszes bokaízületekben, azonban ez a TRPA1^{-/-} állatokban szignifikánsan kisebbnek bizonyult. A vaszkuláris permeabilitás fokozódást jelző fluoreszcencia is jelentősen megemelkedett korai fázisban mindkét csoportban, azonban különbséget nem tapasztaltunk közöttük. Ezzel szemben a késői fázisban (7. napon), amikor a plazmafehérje kiáramlás már csökkenő tendenciát mutatott, szignifikáns különbséget detektáltunk TRPA1^{-/-} egerekben.

1.3. A CFA-indukált szövettani károsodás mértéke kisebb volt TRPA1^{-/-} egerek tibiotarzális ízületeiben

A TRPA1^{+/+} és a TRPA1^{-/-} egerek intakt ízületi mintáiban szövettani eltérést nem találtunk. A CFA adást követő 10. napon, amikor a gyulladás elérte a maximumát, a TRPA1^{+/+} egerek tibiotarzális ízületeiben jelentős mononukleáris sejt infiltrációt és szinoviális hiperpláziát, illetve minimális porcdestrukciót észleltünk csonterózió nélkül. Ezzel szemben TRPA1^{-/-} egerek esetén a szinoviumban kisebb mértékű gyulladással sejt infiltrációt és enyhe szinoviális hiperpláziát láttunk, míg porcdestrukció és csonterózió egyáltalán nem fordult elő. Az említett hisztopatológiai paraméterek szemikvantitatív értékelése során a TRPA1^{-/-} csoportban szignifikánsan kisebb összetett artritisz pontszám volt megfigyelhető a TRPA1^{+/+} csoporthoz képest.

1.4. A K/BxN szérum-indukált késői mechanikai hiperalgéria kisebb, az ödéma nagyobb TRPV1 receptor hiánya esetén

WT és TRPA1^{+/+} egerekben is jelentős mechanikai hiperalgéria és lábduzzadás jött létre az artritogén szérum adását követően, ami 9. (25-31%) és 7-9. napra (50%) érte el maximumát. TRPV1^{-/-} csoportban az 5. és 9. nap között szignifikánsan nagyobb lábduzzadást, míg a gyulladás lezajlását követően, a 17. naptól kezdve szignifikánsan kisebb mechanikai hiperalgériát tapasztaltunk a WT csoporthoz képest. A TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} csoportot összehasonlítva nem találtunk szignifikáns különbséget egyik esetben sem.

1.5. TRPA1 és TRPV1 receptor hiánya nem befolyásolta a neutrofil MPO aktivitás mértékét K/BxN szérum-transzfer artritiszben

A neutrofil granulociták MPO aktivitását indirekt módon jelző biolumineszcencia, amely a szérum adást követő 2. nap érte el maximumát, hasonló mértékű volt az artritiszes vad típusú, TRPV1^{-/-} és TRPA1^{-/-} egerek bokaízületeiben.

1.6. K/BxN szérum-transzfer artritisz modellben TRPV1^{-/-} egerek bokaízületeiben kisebb, TRPA1^{-/-} csoportban nagyobb plazmafehérje kiáramlás detektálható

Artritisz késői fázisában (6. és 9. nap), amikor a boka- és a láb kisízületeiben a vaszkuláris permeabilitás mértéke a legnagyobb, TRPV1^{-/-} csoportban szignifikánsan kisebb, TRPA1^{-/-} csoportban szignifikánsan nagyobb plazmafehérje kiáramlást tapasztaltunk.

1.7. A karragenin-indukált mechanikai hiperalgéria, lábduzzadás, termális hiperalgéria és hidegérzékenység nem különbözött TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} egerek között

Mind a TRPA1^{+/+}, mind a TRPA1^{-/-} csoportban jelentős mechanikai és termális hiperalgéria, lábtérfogat növekedés, illetve hidegérzékenység alakult karragenin i.pl. adását követően, azonban szignifikáns különbséget nem találtunk a két csoport között.

1.8. TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} egerekben hasonló mértékű CFA-indukált mechanikai hiperalgéria és térdízületi ödéma figyelhető meg

Intraartikuláris (i.a.) CFA adást követően a TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} csoportban is hasonló mértékű mechanikai hiperalgéria és térdízületi duzzadás alakult ki, szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk a két csoport között.

2. Az SSAO szerepe ízületi gyulladás és fájdalom egérmódeljeiben

2.1. Az SSAO-gátló vegyületek csökkentik a K/BxN szérum-indukált mechanikai hiperalgériát és ízületi gyulladást

Az oldószerrel kezelt artritiszes egereknél 20%-os mechanikai hiperalgériát és 35%-os lábtérfogat növekedést figyeltünk meg 5 nappal a K/BxN szérum adását követően. A naponta

SSAO-gátló (i.p. 20 mg/kg SzV-1287 és LJP-1207) kezelésben részesülő artritiszes csoportoknál hasonló mértékű és szignifikánsan kisebb mechanikai hiperalgéziát, lábduzzadást és artritisz súlyossági pontszámot detektáltunk a kísérlet során. Az artritisz kiváltását követően csökkent az ízületi funkciót jelző rácson töltött idő, de ezt a paramétert egyik vegyület sem javította.

2.2. LJP-1207 csökkenti a neutrofil MPO aktivitást K/BxN szérumszintje után kialakuló artritisz korai fázisában

A luminol segítségével vizualizálható neutrofil MPO aktivitás az oldószerrel és az SSAO-gátló vegyületekkel kezelt artritiszes egerek bokaízületeiben is fokozódott 2 nappal a K/BxN szérumszintje után, azonban ezt csak az LJP-1207 csökkentette szignifikánsan.

2.3. LJP-1207 a korai és a késői, míg SzV-1287 csak a korai plazmafehérje extravazációt csökkenti K/BxN szérumszintje után kialakuló artritiszben

K/BxN artritisz korai fázisában (2. nap) mindkét SSAO-gátló vegyület szignifikánsan csökkentette az IR-676 fluoreszcens festékkel kimutatható éráteresztőképességet, míg késői fázisban (6. nap), amikor a plazmafehérje kiáramlás elérte a maximumát, csak az LJP-1207-tel kezelt csoportban figyeltünk meg szignifikáns csökkenést.

2.4. Az SSAO-gátló vegyületek csökkentik a CFA-indukált mechanikai hiperalgéziát és ödémát

Az oldószerrel, SzV-1287-tel és LJP-1207-tel kezelt egereknél is jelentős mechanikai hiperalgéziát és lábduzzadást tapasztaltunk CFA i.p. adását követően, amelyet LJP-1207 és SzV-1287 is szignifikánsan csökkentett.

2.5. Egyik SSAO-gátló vegyület sem befolyásolta a CFA-indukált neutrofil MPO aktivitás és plazmafehérje extravazáció mértékét

Az oldószerrel, az SzV-1287-tel és az LJP-1207-tel kezelt állatok tibiotarzáris ízületeiben is jelentős neutrofil MPO aktivitás és érpermeabilitás fokozódás volt látható CFA adását követően, azonban szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk az egyes csoportok között egyik esetben sem.

2.6. Az SSAO-gátlók kizárólag KC szintjét csökkentették a vizsgált proinflammatorikus citokinek közül az artritiszes tibiotarzáris ízületekben

K/BxN szérumszintje után csak KC és MIP-2, CFA adását követően IL-6, KC, MIP-2 és TNF- α koncentrációja is szignifikánsan megemelkedett a kísérlet 4. napján az oldószerrel kezelt artritiszes CD1 egerek ízületi homogenizátumaiban a kontroll állatokhoz képest. Az SSAO-gátlók (K/BxN szérumszintje után kialakuló artritiszben SzV-1287, CFA-modellben LJP-1207) kizárólag KC koncentrációját csökkentették szignifikánsan ebben az időpontban. A vizsgált

citokinek plazmakoncentrációja, illetve az IL-1 β ízületi homogenizátumban mért koncentrációja nem emelkedett szignifikánsan az artritiszes állatokban.

2.7. SzV-1287 csökkenti CFA-indukált artritiszben a szövettani károsodás mértékét

CFA az oldószerrel kezelt állatok bal tibiotarzális ízületeiben artritiszre jellemző szövettani elváltozásokat (szinoviális hiperpláziát, mononukleáris sejt infiltrációt, porcdestrukciót) eredményezett. Ezek közül SzV-1287 a gyulladós sejt beáramlás és a porckárosodás mértékét is jelentősen csökkentette, míg LJP-1207 a kisebb szinoviális mononukleáris sejt infiltráció mellett súlyosabb porcdestrukciót és szinoviális hiperpláziát okozott. Az említett hisztopatológiai paraméterek szemikvantitatív értékelése során csak az SzV-1287-tel kezelt csoportban találtunk szignifikánsan kisebb összetett artritisz pontszámot az oldószerrel kezelt csoporthoz képest.

2.8. LJP-1207 csökkenti a metakromáziásan festődő porcmátrix mennyiségét „micromass” sejt kultúrában

Az *in vivo* eredményeinkkel összhangban, SzV-1287 nem, míg LJP-1207 szignifikánsan csökkentette a metakromáziásan festődő porcmátrix mennyiségét a porcosodó mezenchimális sejt kultúrákban *in vitro*.

3. A TRPA1 és TRPV1 receptorok és az SSAO kapcsolata ízületi gyulladás és fájdalom egérmodelljeiben

3.1. SzV-1287 csökkenti a TRPV1 aktiváció-indukált akut termális és mechanikai hiperalgéziát

Szelektív TRPV1 agonista RTX i.pl. adását követően jelentős, kb. 8°C fokos termális és kb. 45%-os mechanikai hiperalgécia alakult ki az oldószerrel kezelt csoportban. Az akut termális hiperalgécziát csak SzV-1287, míg a centrális szenzitizációs mechanizmusoknak is köszönhető mechanikai hiperalgécziát LJP-1207 is szignifikánsan csökkentette.

3.2. SzV-1287 csökkenti a TRPA1 aktiváció-indukált akut nocifenzív reakció és mechanikai hiperalgécia mértékét

A TRPA1 agonista formalin i.pl. adása által kiváltott elhárító reakció időtartama korai fázisban (0-5 perc) kizárólag SzV-1287-tel kezelt csoportban volt szignifikánsan rövidebb, míg a késői fázisban (20-45 perc) nem találtunk szignifikáns különbséget az SSAO-gátlóval és az oldószerrel kezelt csoportok között. 2 órával a formalin adása után 35%-os mechanikai hiperalgécia jött létre az oldószerrel kezelt csoportban, amelyet mindkét SSAO-gátló vegyület szignifikánsan csökkentett.

3.3. SzV-1287 csökkenti a krónikus mechanikai hiperalgéziát és ödémát arthritiszos WT és TRPA1^{-/-} egerekben

Az oldószerrel kezelt WT csoportban a kísérlet 5. napjára kb. 25-30%-os mechanikai hiperalgézia, a 9. napra pedig kb. 50%-os lábterfogat növekedés alakult ki. A naponta alkalmazott i.p. 20 mg/kg SzV-1287 WT és TRPA1^{-/-} csoportban szignifikánsan csökkentette, míg TRPV1^{-/-} egerekben nem befolyásolta a K/BxN szérum-indukált mechanikai hiperalgéziát és lábduzzadást.

3.4. SzV-1287 csökkenti a korai neutrofil MPO aktivitást az arthritiszos WT és TRPV1^{-/-} egerek bokaízületeiben

WT és TRPV1^{-/-} csoport arthritiszos bokaízületeiben a fokozott neutrofil MPO aktivitást demonstráló intenzív biolumineszcenciát SzV-1287 kezelés korai fázisban szignifikánsan csökkentette, míg TRPA1^{-/-} csoportban nem volt ilyen jellegű hatása.

3.5. SzV-1287 egyik egértörzsből sem befolyásolta a K/BxN szérum-indukált plazmafehérje kiáramlás mértékét

A vaszkuláris permeabilitás fokozódást jelző fluoreszcens jelintenzitás 2. naptól kezdve fokozatosan emelkedett mindegyik arthritiszos törzsből, majd a 9. napon elérte a maximumát, az SzV-1287 kezelés azonban egyik csoportban sem befolyásolta ezt a paramétert.

3.6. SzV-1287 csökkenti a neuropátiás mechanikai hiperalgéziát

Traumás mononeuropátia modell 7. napján csak SzV-1287 és LJP-1207 csökkentette szignifikánsan a mechanikai hiperalgéziát az oldószerrel kezelt csoporttal összehasonlítva, míg SzV-1287 aktív metabolitja (oxaprozin) és a referencia NSAID (diklofenák) nem befolyásolta ezt. SzV-1287 5, 10 és 20 mg/kg dózisban is hasonló mértékű, kb. 50-60%-os antihiperalgéziás hatást váltott ki, csak 2 mg/kg dózisban nem eredményezett szignifikáns fájdalomküszöb csökkenést. WT csoporttal ellentétben TRPV1^{-/-} és TRPA1^{-/-} csoportokban SzV-1287 nem csökkentette a neuropátiás mechanikai hiperalgéziát.

MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

Munkánk első részében bizonyítottuk a TRPA1 receptor szabályozó szerepét adjuváns-, a TRPV1-ét szérum transzfer-indukált krónikus artritiszben. TRPV1 receptor jelentősége a gyulladásban és a fájdalomtranszmisszióban már régóta ismert [1], azonban TRPA1 receptorral kapcsolatban jóval kevesebb információ áll rendelkezésünkre. Különösen igaz ez krónikus ízületi gyulladásban és fájdalomban játszott szerepével kapcsolatban. Főleg génhányos egerekkel végeztek e tekintetben kevés kísérletet, ezért munkánk során megpróbáltuk pótolni ezeket a hiányosságokat.

CFA-indukált krónikus artritisz modellünkben az irodalmi adatokhoz hasonlóan szignifikánsan kisebb mechanikai hiperalgéziát találtunk TRPA1^{-/-} egerekben [42,49]. Az eddigi eredményekkel ellentétben ugyanezt a különbséget tapasztaltuk ízületi duzzadás és szövettani károsodás tekintetében is, míg a TRPA1 adjuváns-indukált neutrofil aktivációban és vaszkuláris permeabilitás fokozódásban játszott szabályozó szerepéről elsőként közöltünk adatokat az irodalomban. Az ízületi duzzadással és szövettani elváltozásokkal kapcsolatos látszólag ellentmondó eredményeket valószínűleg az alkalmazott modellek és módszerek közötti eltérések okozhatják [42]. Eredményeinket egy szelektív TRPA1-blokkolóval (HC-030031) végzett kísérlet is megerősíti [50]. A TRPA1^{-/-} egerekkel kapott funkcionális és szövettani eredményeink teljesen megegyeznek a korábban TRPV1^{-/-} egerekkel végzett kísérletünk eredményeivel [36], ami alátámasztja a két receptor hasonló funkcionális tulajdonságairól szóló adatokat [51]. A humán betegséghez hasonlóan nem alakult ki számottevő termális hiperalgézia egyik egértörzsben sem CFA-val kiváltott artritiszben, ami megerősíti azokat a korábbi megfigyeléseket, amely szerint a TRPA1 nem játszik szerepet a fájdalmas hő érzékelésében [6,52]. Ezzel szemben TRPA1 hidegérzékelésben játszott szerepe köztudott [2,50,52], azonban a mi kísérleti paradigmánkban nem találtunk különbséget TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} csoport között e tekintetben. A hidegtolerancia a gyulladás súlyosságától függetlenül mindkét törzsben csökkent CFA adását követően, ami alapján azt feltételezhetjük, hogy a fokozott hidegérzékenységet az ismételt mérések okozhatták. Ebből arra következtethetünk, hogy az általunk alkalmazott vizsgálati módszer nem alkalmas a hidegérzékenység vizsgálatára ebben a modellben.

Az aktív immunizációs mechanizmusokat magába foglaló CFA-moddal ellentétben az autoantitesteket és citokineket tartalmazó szérum passzív transzferén alapuló K/BxN-modellben a mechanikai hiperalgézia, a lábduzzadás és a neutrofil MPO aktivitás mértéke is hasonló volt a TRPA1^{+/+} és a TRPA1^{-/-} csoportban. TRPA1-nek mindössze a késői vaszkuláris

permeabilitás fokozódás mérséklésében feltételezhetjük részleges szerepét ebben a modellben, mivel 6. nap szignifikánsan nagyobb plazmafehérje kiáramlást tapasztaltunk a TRPA1^{-/-} csoportban. Ezzel szemben TRPV1^{-/-} egerekben szignifikánsan kisebb K/BxN szérum-indukált mechanikai hiperalgéziát és plazmafehérje extravazációt, illetve súlyosabb gyulladási tüneteket tapasztaltunk, míg a ROS termelés mértékét nem befolyásolta a receptor hiánya. Korábban a kapszaicin-érzékeny érzőideg végződés deszenzibilizációjának hatását vizsgálva ugyanebben a modellben munkacsoportunk ezzel megegyező funkcionális eredményeket kapott, és a deszenzibilizációt követő súlyosabb gyulladási tüneteket az antiinflammatorikus hatású szomatosztatin csökkent felszabadulásával magyarázta [38].

Karragenin-indukált akut gyulladás modellünkben az irodalmi adatokkal ellentétben nem találtunk szignifikáns különbséget a TRPA1^{+/+} és a TRPA1^{-/-} egércsoport között sem lábduzzadás, sem mechanikai, sem termális hiperalgézia tekintetében. Más kutatócsoportok ezzel szemben TRPA1 szerepét igazolták szelektív antagonistá (HC-030031) és génhányos egerek segítségével a karragenin-indukált mechanikai hiperalgéziában, illetve lábduzzadásban [53,54]. A különbségeket valószínűleg a különböző fajok (patkány vs. egér), mérési időpontok és vizsgálati módszerek okozhatják. Mivel TRPA1 funkcionális egységet képez TRPV1 receptorral az érzőideg végződéseken [51], ezért fontos megjegyezni, hogy korábban ugyanezekkel a módszerekkel TRPV1^{-/-} és WT egerek között sem találtunk különbséget a karragenin-indukált mechanikai hiperalgézia és lábduzzadás vonatkozásában [41]. A karragenin-modellhez hasonlóan TRPA1 receptor hiánya, az irodalmi adatokkal összhangban, nem befolyásolta az akut mechanikai hiperalgézia és térdízületi duzzadás kialakulását egyik mérési időpontban sem a 24 órás kísérleti periódus során az i.a. CFA-val indukált gyulladás modellünkben [42,55].

Az általunk alkalmazott négy modellben a TRPA1 funkciójával kapcsolatban kapott eltérő eredményeket a TRPA1 széles szöveti eloszlásával magyarázhatjuk [3]. Számos adat bizonyítja, hogy a gyulladás során lokálisan keletkező endogén TRPA1 agonisták különböző módon képesek befolyásolni a receptor működését az érzőideg végződéseken és a nem neurális sejteken, ami a gyulladási kaskád aktiválását vagy épp gátlását eredményezheti [56,57]. Eredményeink alapján TRPA1 és TRPV1 is fontos szabályozó szerepet tölt be krónikus artritisz patomechanizmusában, ezért ígéretes támadáspontjai lehetnek új hatásmechanizmusú gyulladási- és fájdalomcsillapító szereknek.

Munkánk második részében elsőként szolgáltatunk adatokat az SSAO-gátlás analgetikus hatásával kapcsolatban krónikus ízületi gyulladás és fájdalom egérmodelljeiben. Az SSAO gyulladásban játszott központi szerepe és az SSAO-gátló vegyületek gyulladáscsökkentő

hatása, többek között ízületi gyulladás modellekben, már régóta ismert [13,16,17]. Azonban nocicepcióban betöltött esetleges funkciójával és az enzimgátló vegyületek esetleges fájdalomcsillapító hatásával kapcsolatban nem álltak rendelkezésünkre adatok.

Kísérleteink középpontjában azonban nemcsak az SSAO-gátlás fájdalomcsillapító hatásának vizsgálata, hanem egy új, komplex hatásmechanizmusú, munkacsoportunk által szabadalmaztatott SSAO-gátló vegyület tanulmányozása is állt. SzV-1287 a referencia vegyülethez hasonlóan két különböző mechanizmusú krónikus arthritisz modellben is hatékonynak bizonyult. Mindkét vegyület szignifikánsan csökkentette a K/BxN szérumszintet és CFA-indukált mechanikai hiperalgéziát és lábduzzadást, illetve a K/BxN szérumszintet indukált korai plazmafehérje extravazációt. K/BxN szérumszintet indukált arthritisz modellben a késői plazmafehérje kiáramlást csak a referencia vegyület csökkentette szignifikánsan, a neutrofil MPO aktivitást egyik vegyület sem befolyásolta, hasonlóan a CFA-indukált neutrofil aktivációhoz és vaszkuláris permeabilitás fokozódáshoz. Az alkalmazott arthritisz modellek patomechanizmusában fontos szerepet játszó, öt jellegzetes gyulladásos citokin közül (IL-1 β , IL-6, KC, MIP-2, TNF- α) az SSAO-inhibitorok kizárólag a makrofágok, endotél sejtek, szinoviociták által termelt, neutrofil kemoattraktáns KC szintjét csökkentették szignifikánsan az arthritiszes ízületi homogenizátumokban. K/BxN szérumszintet indukált arthritiszben SzV-1287, CFA-modellben LJP-1207 csökkentette szignifikánsan az említett citokin szintjét. Ebből arra következtethetünk, hogy az SSAO-gátlók gyulladás- és fájdalomcsillapító hatása nem elsősorban a citokin termelés gátlásából fakad.

Bár SzV-1287 és a referencia vegyület LJP-1207 adását követően hasonló mértékű, szignifikánsan kisebb mechanikai hiperalgéziát és lábduzzadást figyeltünk meg az oldószerrel kezelt csoporthoz képest, a CFA-indukált szövettani károsodás vonatkozásában jelentős különbséget tapasztaltunk. Míg SzV-1287 szignifikánsan csökkentette a szövettani elváltozások közül a szinoviális mononukleáris sejtinfiltrációt és a porcárosodás mértékét, addig a krónikus LJP-1207 kezelés jelentős porcdestrukciót eredményezett. *In vivo* megfigyelésünket *in vitro* is sikerült megerősíteni, hiszen a két vegyület közül csak LJP-1207 csökkentette szignifikánsan a metakromáziáson festődő porcmátrix mennyiségét kondrocita sejt kultúrában. LJP-1207 porcárosító hatása valószínűleg nem az SSAO-gátló hatás következménye, mivel egy másik munkacsoport nem olyan régen SSAO-gátló alkalmazása mellett a kondrocita differenciáció késleltetését tapasztalta a porcsejtek életképességének befolyásolása nélkül *in vitro* [58]. Az említett nem kívánt hatás hátterében LJP-1207 kémiai szerkezete állhat, hiszen allilhidrazin derivátum révén potenciálisan toxikus vegyületnek számít [21]. SzV-1287 kisebb mértékű porcárosító hatását az *in vitro* megfigyelt TRPA1/TRPV1

antagonista hatása magyarázhatja, hiszen egy szintén nemrég közölt publikációban TRPA1 hiánya protektív tényezőnek bizonyult monojódom-acetát (MIA)-indukált porckárosodásban [49]. Amellett, hogy elsőként szolgáltatunk adatokat az SSAO-gátlás fájdalomcsillapító hatásáról, új SSAO-gátló vegyületünk (SzV-1287) artritiszes tüneteket csökkentő és porcvédő hatását is igazoltuk. Utóbbi eredmények alapján SzV-1287 ígéretes vegyület lehet gyógyszerfejlesztés szempontjából.

Munkánk harmadik részében TRPA1 és TRPV1 receptorok funkcióját tisztáztuk SzV-1287 hatásmechanizmusában. Korábban munkacsoportunk vetette fel először a gyulladásban és a fájdalom közvetítésében is fontos TRPA1 és az endogén agonistáit is termelő SSAO lehetséges kapcsolatát, majd *in vitro* igazolta újonnan szabadalmaztatott SSAO-gátló vegyületünk, SzV-1287 közvetlen TRPA1 és TRPV1 antagonistá hatását érző neuronokon és idegvégződéseken is [25]. *In vivo* SzV-1287 szignifikánsan csökkentette a gyorsan kialakuló, TRPV1 és TRPA1 aktiváció-indukált akut termális hiperalgéziát és elhárító reakciót, illetve a lassan kialakuló mechanikai hiperalgéziát is, míg a referencia vegyület LJP-1207 csak a centrális szenzitizációs mechanizmusoknak köszönhető mechanikai hiperalgéziát csökkentette mindkét modellben. Ebből arra következtethetünk, hogy a vegyületek mechanikai hiperalgéziát csökkentő hatását az SSAO gátlás eredményezheti, míg SzV-1287 direkt TRPA1/TRPV1 blokkoló hatásának az érzőideg végzések gyors perifériás szenzitizációjának gátlásában lehet szerepe.

A K/BxN szérumból ismételt injekciójával kiváltott autoimmun artritisz modellünkben SzV-1287 TRPV1^{-/-} egerekben nem csökkentette a krónikus, neuropátiás jellegű mechanikai hiperalgéziát, TRPA1^{-/-} és TRPV1^{-/-} egerekben az ödémát, TRPA1^{-/-} egerekben pedig a neutrofil MPO aktivitást, ezért ebből arra következtethetünk, hogy SzV-1287 antihiperalgéziás hatása valószínűleg TRPV1, ödémagátló hatása TRPV1- és TRPA1, míg neutrofil aktiváció gátló hatása TRPA1-függő folyamat. A tisztán neuropátiás mechanizmusú traumás idegkárosodás modellben szintén igazoltuk SzV-1287 fájdalomcsillapító hatását, ugyanis 20 mg/kg dózisban egyszeri adást követően kb. 65%-os fájdalomküszöb csökkenést eredményezett az oldószerral kezelt vad típusú csoporthoz képest. A 7 napos ismételt adagolás esetén sem fokozódott a vegyület hatása, ami arra utal, hogy vegyületünk akut fájdalomcsillapító hatással rendelkezik, és nem befolyásolja a neuropátiás fájdalom kialakulását. SzV-1287 sem TRPV1^{-/-}, sem TRPA1^{-/-} csoportban nem csökkentette a neuropátiás mechanikai hiperalgéziát, ami arra utalhat, hogy SzV-1287 antihiperalgéziás hatását mindkét, érzőideg végződésen funkcionális egységet képező receptor közvetíti. SzV-1287 és LJP-1207 antihiperalgéziás hatása között ebben a modellben sem találtunk szignifikáns különbséget, tehát SzV-1287 fájdalomcsillapító hatásában valószínűleg az SSAO-gátló hatás játsza a kulcsszerepet. A referencia vegyületek

közül diklofenák és az aktív metabolit oxaprozin is hatástalannak bizonyult a modellben, amiből arra következtethetünk, hogy a COX gátlás nem játszik szerepet a SzV-1287 neuropátiás fájdalmat csökkentő hatásában.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy SzV-1287 gyulladásgátló hatásától részben függetlenül, potens fájdalomcsillapító hatással rendelkezik neuropátiás mechanizmusú, krónikus fájdalom modellekben is, amely TRPV1-mediált immun-mediált artritiszben, míg TRPV1/TRPA1-mediált traumás mononeuropátiában. Eredményeink kiváló alapot szolgáltattak egy új gyógyszerjelölt preklinikai fejlesztésének elindításához, amelyet az „Új, több támadáspontú innovatív fájdalomcsillapító fejlesztése: hatástani, preklinikai és humán fázis I. vizsgálatok” című GINOP-2.2.1-15-2016-00020 pályázat keretén belül kívánunk megvalósítani. A preklinikai dosszié lezárása 2019 végére várható, majd ezt követően indulhatnak a humán fázis I. vizsgálatok, amelynek befejezését 2020-ra tervezzük. Reményeink szerint SzV-1287 a jövőben áttörést hozhat az idegi eredetű (neuropátiás) fájdalomállapotok kezelésben.

ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Eredményeink alapján TRPA1 és TRPV1 is fontos szabályozó szerepet tölt be krónikus artritisz patomechanizmusában, ezért ígéretes támadáspontjai lehetnek új hatásmechanizmusú gyulladásgátló- és fájdalomcsillapító szereknek.
2. Elsőként szolgáltattunk adatokat az SSAO-gátlás fájdalomcsillapító hatásáról, illetve új, komplex hatásmechanizmusú SSAO-gátló vegyületünk, SzV-1287 artritiszes tüneteket csökkentő és porcvédő hatásáról.
3. SzV-1287 gyulladásgátló hatásától részben függetlenül, potens fájdalomcsillapító hatással rendelkezik neuropátiás mechanizmusú, krónikus fájdalom modellekben is, amely TRPV1-mediált immun-mediált artritiszben, míg TRPV1/TRPA1-mediált traumás mononeuropátiában.

IRODALOMJEGYZÉK

1. **Caterina MJ**, és mtsai. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997;389:816-24.
2. **Story GM**, és mtsai. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 2003;112:819-29.
3. **Fernandes ES**, és mtsai. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. *Br J Pharmacol* 2012;166:510-21.
4. **Chen J**, Hackos DH. TRPA1 as a drug target-promise and challenges. *Naunyn-Schmiedberg Arch Pharmacol* 2015;388:451-63.
5. **Szállási Á**, Blumberg PM. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* 1999;51:159-212.
6. **Bautista DM**, és mtsai. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 2006;124:1269–82.
7. **Holzer P**. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev* 1991;43: 143-201.
8. **Szolcsányi J**. Capsaicin-sensitive chemoceptive neural system with dual sensory-efferent function. In: Chahl LA, Szolcsányi J, Lembeck F, editors. *Antidromic Vasodilatation and Neurogenic Inflammation*. Budapest, Hungary: Akadémiai Kiadó; 1984. pp. 27-53.
9. **Helyes Zs**, és mtsai. Anti-nociceptive effect induced by somatostatin released from sensory nerve terminals and by synthetic somatostatin analogues in the rat. *Neurosci Lett* 2000;278:185-8.
10. **Helyes Zs**, és mtsai. Regulatory role of sensory neuropeptides in inflammation. In: Kovács M, Merchenthaler I, editors. *Neuropeptides and peptide analogs*. Kerala, India: Research Signpost; 2009. pp. 111-141.
11. **Yu PH**, és mtsai. Physiological and pathological implications of semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Biochim Biophys Acta* 2003;1647:193-9.
12. **Andrés N**, és mtsai. Tissue activity and cellular localization of human semicarbazide-sensitive amine oxidase. *J Histochem Cytochem* 2001;49:209-17.
13. **Salmi M**, Jalkanen S. VAP-1: An adhesin and an enzyme. *Trends Immunol* 2001;22:211-16.
14. **Noda K**, és mtsai. Vascular adhesion protein-1 blockade suppresses choroidal neovascularization. *FASEB J* 2008;22:2928-35.
15. **Pannecoeck R**, és mtsai. Vascular adhesion protein-1: Role in human pathology and application as a biomarker. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2015;52:284-300.
16. **Salter-Cid LM**, és mtsai. Anti-inflammatory effects of inhibiting the amine-oxidase activity of semicarbazide-sensitive amine oxidase. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;315:553-62.
17. **Marttila-Ichihara F**, és mtsai. Vascular amine oxidases are needed for leukocyte extravasation into inflamed joints in vivo. *Arthritis Rheum* 2006;54:2852-62.
18. **Noda K**, és mtsai. Vascular adhesion protein-1 regulates leukocyte transmigration rate in the retina during diabetes. *Exp Eye Res* 2009;89:774:81.
19. **Marttila-Ichihara F**, és mtsai. Small-molecule inhibitors of vascular adhesion protein-1 reduce the accumulation of myeloid cells into tumors and attenuate tumor growth in mice. *J Immunol* 2010;184:3164-73.
20. **Jarnicki AG**, és mtsai. A novel SSAO inhibitor PXS-4728A suppresses inflammation and fibrosis and improves lung function in experimental chronic obstructive pulmonary disease. *Br J Pharmacol* 2016;doi: 10.1111/bph.13573.

21. **Foot JS**, és mtsai. PXS-4681A, a potent and selective mechanism-based inhibitor of SSAO/VAP-1 with anti-inflammatory effects in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 2013;347:365-74.
22. **Mátyus P**, és mtsai. Compounds for inhibiting semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO)/vascular adhesion protein-1 (VAP-1) and uses thereof for treatment and prevention of diseases. 2010;PCT Int Appl WO/2010/029379.
23. **Helyes Zs**, és mtsai. Semicarbazide-sensitive amine-oxidase inhibitors, as analgesics in traumatic neuropathy and neurogenic inflammation. 2014; Hungarian and USA PCT P1400205.
24. **Mátyus P**, Chai CL. Metabolism-activated multitargeting (MAMUT): An innovative multitargeting approach to drug design and development. *Chem Med Chem* 2015;doi: 10.1002/cmdc.201500406.
25. **Payrits M**, és mtsai. A novel 3-(4,5-diphenyl-1,3-oxazol-2-yl)propanal oxime compound is a potent Transient Receptor Potential Ankyrin 1 and Vanilloid 1 (TRPA1 and V1) receptor antagonist. *Neuroscience* 2016;324:151-62.
26. **Poór Gy**. Áttörés az ízületi gyulladások kezelésében. *Magyar Tudomány* 2014;8:958-64.
27. **Gibovsky A**. Overview of epidemiology, aetiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am J Manag Care* 2012;18:S295-302.
28. **Szekanecz Z**. A rheumatoid arthritis gyakorlati kérdései. *Háziorvos Továbbképző Szemle* 2004;9:17-22.
29. **Smolen JS**, és mtsai. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann Rheum Dis* 2014;73:492-509.
30. **Aronson JK**. Meyler's side effects of analgesics and anti-inflammatory drugs. Amsterdam: Elsevier; 2009.
31. **Coutinho AE**, Chapman KE. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Mol Cell Endocrinol* 2011;335:2-13.
32. **Ramiro S**, és mtsai. Safety of synthetic and biological DMARDs: a systematic literature review informing the 2013 update of EULAR recommendations for management of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2016;75:16-22.
33. **Jensen TS**, és mtsai. A new definition of neuropathic pain. *Pain* 2011;152:2204-5.
34. **Bouhassira D**, és mtsai. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain* 2008;136:380-7.
35. **Attal N**, és mtsai. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *Eur J Neurol* 2010;17:1113-23.
36. **Szabó Á**, és mtsai. Role of TRPV1 receptors in adjuvant-induced chronic arthritis: in vivo study using gene-deficient mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;314:111 –9.
37. **Jakus Z**, és mtsai. Critical role of phospholipase C γ 2 in integrin and Fc receptor-mediated neutrophil functions and the effector phase of autoimmune arthritis. *J Exp Med* 2009;206:577-93.
38. **Borbély É**, és mtsai. Capsaicin-sensitive sensory nerves exert complex regulatory functions in the serum-transfer mouse model of autoimmune arthritis. *Brain Behav Immun* 2015;45:50-9.
39. **Seltzer Z**, és mtsai. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 1990;43:205-18.
40. **Malmberg AB**, Basbaum AI. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain* 1998;76:215-22.

41. **Bölcseki K**, és mtsai. Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain* 2005;117:368-76.
42. **Fernandes ES**, és mtsai. A distinct role for transient receptor potential ankyrin 1, in addition to transient receptor potential vanilloid 1, in tumor necrosis factor α -induced inflammatory hyperalgesia and Freund' complete adjuvant-induced monarthritis. *Arthritis Rheum* 2011;63:819–29.
43. **Almási R**, és mtsai. Effect of resiniferatoxin on the noxious heat threshold temperature in the rat: a novel heat allodynia model sensitive to analgesics. *Br J Pharmacol* 2003;139:49-58.
44. **Helyes Zs**, és mtsai. Involvement of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in protease-activated receptor-2-induced joint inflammation and nociception. *Eur J Pain* 2010;14:351-8.
45. **Tékus V**, és mtsai. A CRPS-IgG-transfer-trauma model reproducing inflammatory and positive sensory signs associated with complex regional pain syndrome. *Pain* 2014;155:299-308.
46. **Botz B**, és mtsai. Differential regulatory role of Pituitary Adenylate-Cyclase Activating Polypeptide in the serum-transfer-induced arthritis model. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:2739-50.
47. **Bánki E**, és mtsai. Effect of PACAP treatment on kidney morphology and cytokine expression in rat diabetic nephropathy. *Peptides* 2013;42:125-30.
48. **Matta C**, és mtsai. Cytosolic free Ca²⁺ concentration exhibits a characteristic temporal pattern during in vitro cartilage differentiation: a possible regulatory role of calcineurin in Ca-signalling of chondrogenic cells. *Cell Calcium* 2008;44:310-23.
49. **Moilanen LJ**, és mtsai. Monosodium iodoacetate-induced inflammation and joint pain are reduced in TRPA1 deficient mice--potential role of TRPA1 in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2015;23:2017-26.
50. **da Costa DSM**, és mtsai. The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. *Pain* 2010;148:431-7.
51. **Spahn V**, és mtsai. Modulation of transient receptor vanilloid 1 activity by transient receptor potential ankyrin 1. *Mol Pharmacol.* 2014;85:335-44.
52. **Kwan KY**, és mtsai. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron.* 2006;50:277–89.
53. **Moilanen LJ**, és mtsai. TRPA1 contributes to the acute inflammatory response and mediates carrageenan-induced paw edema in the mouse. *Sci Rep* 2012;2:380.
54. **Bonet IJM**, és mtsai. The role of transient receptor potential A 1 (TRPA1) in the development and maintenance of carrageenan-induced hyperalgesia. *Neuropharmacology* 2013;65:206-12.
55. **Petrus M**, és mtsai. A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. *Mol Pain* 2007;3:40.
56. **Atoyan R**, és mtsai. Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin. *J Invest Dermatol* 2009;129:2312-15.
57. **Chao LK**, és mtsai. Cinnamaldehyde inhibits pro-inflammatory cytokines secretion from monocytes/macrophages through suppression of intracellular signaling. *Food Chem Toxicol* 2008;46:220-31.
58. **Filip A**, és mtsai. Expression of the semicarbazide-sensitive amine oxidase in articular cartilage: its role in terminal differentiation of chondrocytes in rat and human. *Osteoarthritis Cartilage* 2016;24:1223-34.

PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

1. Az értekezés alapját képező eredeti közlemények:

Horváth Á, Tékus V, Boros M, Pozsgai G, Botz B, Borbély É, Szolcsényi J, Pintér E, Helyes Zs. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor is involved in chronic arthritis: in vivo study using TRPA1-deficient mice. *Arthritis Res Ther* 2016;18:6. (IF: 3,979)

Horváth Á*, Menghis A*, Botz B, Borbély É, Kemény Á, Tékus V, Csepregi J, Mócsai A, Juhász T, Zákány R, Bogdán D, Mátyus P, Keeble J, Pintér E, Helyes Z. Analgesic and anti-inflammatory effects of the novel semicarbazide-sensitive amine-oxidase inhibitor SzV-1287 in chronic arthritis models of the mouse. *Sci Rep* 2017;7:39863. (IF: 5,228) ***Megosztott első szerzők**

Horváth Á, Tékus V, Bencze N, Szentes N, Scheich B, Bölcskei K, Szőke É, Mócsai A, Tóth-Sarudy É, Mátyus P, Pintér E, Helyes Z. Analgesic effects of the novel semicarbazide-sensitive amine oxidase inhibitor SzV-1287 in mouse pain models with neuropathic mechanisms: involvement of TRPV1 and TRPA1 receptors. *Közlésre benyújtva a Pain folyóirathoz.*

2. Egyéb teljes közlemény:

Tékus V, **Horváth Á**, Hajna Zs, Borbély É, Bölcskei K, Boros M, Pintér E, Helyes Zs, Pethő G, Szolcsányi J. Noxious heat threshold temperature and pronociceptive effects and pronociceptive effects of allyl isothiocyanate (mustard oil) in TRPV1 or TRPA1 gene-deleted mice. *Life Sci* 2016;154:66-74. (IF: 2,685)

Az értekezés alapját képező eredeti közlemények kumulatív impakt faktora: 9,207

Az összes publikáció kumulatív impakt faktora: 11,892

Hivatkozások száma: 5

Független hivatkozások száma: 3

3. Konferencia szóbeli előadások:

Horváth Á. Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1 (TRPV1) és Ankyrin 1 (TRPA1) ioncsatornák szerepének vizsgálata a termonocicepcióban. Kari TDK konferencia, Pécs, Magyarország, 2012.

Horváth Á. Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1 (TRPV1) és Ankyrin 1 (TRPA1) ioncsatornák szerepének vizsgálata gyulladáshoz fájdalom egérmódeljeiben. Kari TDK konferencia, Pécs, Magyarország; XXXI. OTDK, Szeged, Magyarország; XX. Tudományos Diákköri Konferencia, Marosvásárhely, Románia; V. Nemzetközi és XI. Országos Interdiszciplináris Grastyán Konferencia, Pécs, Magyarország, 2013.

Horváth Á. Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1 (TRPA1) ioncsatorna szerepének vizsgálata akut és krónikus gyulladás egérmódeljeiben. Kari TDK konferencia, Pécs, Magyarország; XXI. Tudományos Diákköri Konferencia, Marosvásárhely, Románia; Pécsi Tudományegyetem Idegtudományi Centrum és Szentágotthai János Kutatóközpont PhD és TDK konferencia, Pécs, Magyarország, 2014.

Horváth Á. Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1 (TRPA1) ioncsatorna szerepének vizsgálata gyulladáshoz fájdalom egérmódeljeiben. Korányi Frigyes Tudományos Fórum, Budapest, Magyarország; VI. Nemzetközi és XII. Országos Interdiszciplináris Grastyán Konferencia, Pécs, Magyarország, 2014.

Horváth Á., Menghis A., Botz B., Borbély É., Csepregi J., Mócsai A., Mátyus P., Pintér E., Szolcsányi J., Helyes Zs. Szemikarbazid-szenzitív aminoxidáz gátlók gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító hatásai krónikus artritisz egérmodelljeiben. VII. Nemzetközi XIII. Országos Interdiszciplináris Grastyán Konferencia; IV. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia; II. Magyar Neuroendokrinológiai Szimpózium, Pécs, Magyarország, 2015.

Horváth Á. Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1 (TRPA1) ioncsatorna szerepének vizsgálata akut és krónikus gyulladás egérmodelljeiben. XXXII. OTDK, Budapest, Magyarország, 2015.

Horváth Á., Menghis A., Botz B., Borbély É., Csepregi J., Mócsai A., Czompa A., Ludmerczki R., Mátyus P., Pintér E., Szolcsányi J., Helyes Zs. Anti-inflammatory and analgesic effects of semicarbazide-sensitive amine-oxidase (SSAO) inhibitors in chronic arthritis mouse models. International CEEPUS Summer School on Complex Diseases, Portoroz, Szlovénia, 2015.

Horváth Á., Tékus V, Boros M, Pozsgai G, Botz B, Borbély É, Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Zs. Mediator role of the Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor is involved in chronic arthritis. Neuropeptides 2015, Aberdeen, Skócia, 2015.

Tékus V, Helyes Z, Hajna Z, **Horváth Á.**, Kun J, Bölcskei K, Pintér E, Szolcsányi J. Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1), but not Ankyrin 1 (TRPA1) ion channels mediate mustard oil-induced hyperalgesia in mice. I. International Doctoral Workshop of Natural Sciences, Pécs, Magyarország, 2012.

Helyes Zs, Scheich B, **Horváth Á.**, Botz B, Tékus V, Czompa A, Ludmerczki R, Pozsgai G, Boros M, Pintér E, Szolcsányi J, Mátyus P. A Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1 (TRPA1) ioncsatorna szerepe és aktivációs mechanizmusa gyulladás és neuropátia egérmodelljeiben. Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság Experimentális Farmakológiai szekciójának IX. szimpóziuma, Velence, Magyarország, 2015.

Helyes Zs, Scheich B, **Horváth Á.**, Botz B, Tékus V, Czompa A, Ludmerczki R, Pintér E, Csepregi J, Szolcsányi J, Mócsai A, Mátyus P. Role and activation mechanism of the Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) ion channel in mouse models of chronic pain. Neuropeptides 2015, Aberdeen, Skócia, 2015.

Pintér E, Pozsgai G, Hajna Z, Sággy E, **Horváth Á.**, Szőke É, Sár C, Bagoly T, Aubdool A, Brain S, Helyes Zs. TRPA1 receptor-mediated effects of H₂S donors and polysulfides. Neuropeptides 2015, Aberdeen, Skócia, 2015.

Pethő G, Tékus V, **Horváth Á.**, Bölcskei K, Helyes Zs, Pintér E, Szolcsányi J. A TRP-ioncsatornák szerepe a nociceptív hőküszöb meghatározásában: régi kérdés, új válaszok. Magyar Farmakológiai, Anatómus, Mikrocirkulációs és Élettani Társaságok közös tudományos konferenciája, Pécs, Magyarország, 2016.

Helyes Z, **Horváth Á.**, Tékus V, Scheich B, Pintér E, Csepregi J, Mócsai A, Bogdán D, Mátyus P. Analgesic effects of the novel semicarbazide-sensitive amine-oxidase inhibitor SzV-1287 in animal models of pain. 7th European Congress of Pharmacology, Isztambul, Törökország, 2016.

4. Konferencia poszter prezentációk:

Horváth Á. A Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1 (TRPA1) ioncsatorna szerepének vizsgálata akut és krónikus gyulladás egérmodelljeiben. Amerikai Magyar Orvosszövetség (HMAA) Hungary Chapter konferenciája, Balatonfüred, Magyarország, 2014.

Horváth Á. Role of the Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) ion channel in the acute and chronic inflammatory pain models of the mouse. 15th Biannual Conference of the Hungarian Neuroscience Society, Budapest, Magyarország, 2015.

Horváth Á., Menghis A., Botz B., Borbély É., Csepregi J., Mócsai A., Mátyus P., Pintér E., Szolcsányi J., Helyes Zs. Szemikarbamid-szenzitív aminoszáz gátlók gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító hatásai krónikus artritisz egérmodelljeiben. Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság Experimentális Farmakológiai szekciójának IX. szimpóziuma, Velence, Magyarország, 2015.

Horváth Á, Borbély É, Bölcskei K, Botz B, Szentes N, Rauch T, Boldizsár F, Pintér E, Helyes Zs. A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződés komplex szabályozó szerepének vizsgálata krónikus ízületi gyulladás egérmodelljében. Magyar Farmakológiai, Anatómus, Mikrocirkulációs és Élettani Társaságok közös tudományos konferenciája, Pécs, Magyarország, 2016.

Horváth Á, Scheich B, Botz B, Tékus V, Szentes N, Csepregi J, Mócsai A, Bogdán D, Mátyus P, Pintér E, Helyes Z. Analgesic effects of a novel semicarbazide-sensitive amine-oxidase inhibitor in neuropathic and inflammatory pain models of the mouse. Regulatory Peptides 2016, Rouen, Franciaország, 2016.

Tékus V, Helyes Zs, Hajna Zs, **Horváth Á,** Kun J, Bölcskei K, Pintér E, Szolcsányi J. A Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1 (TRPV1) és Ankyrin 1 (TRPA1) ioncsatornák szerepének vizsgálata mustárolajjal kiváltott nocifenzív viselkedésben és akut gyulladásos hiperalgégiában. Magyar Farmakológiai, Anatómus, Mikrocirkulációs és Élettani Társaságok közös tudományos konferenciája, Debrecen, Magyarország, 2012.

Tékus V, Hajna Z, **Horváth Á,** Kun J, Bölcskei K, Szolcsányi J, Helyes Z. Role of the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 and Ankyrin 1 (TRPV1 and TRPA1) ion channels in thermociception in mice. IBRO International Workshop, Szeged, Magyarország, 2012.

Tékus V, Helyes Z, Hajna Z, **Horváth Á,** Kun J, Bölcskei K, Pintér E, Szolcsányi J. Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1), but not Ankyrin 1 (TRPA1) ion channels mediate mustard oil-induced hyperalgesia in mice. British Pharmacological Society (BPS) Focused Meeting on Neuropeptides, London, Egyesült Királyság, 2012.

Tékus V, Scheich B, Kóger T, **Horváth Á,** Hajna Z, Borbély É, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Zs. Role of the Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) ion channel in nociceptive processes. Magyar Idegtudományi Társaság XIV. Konferenciája, Budapest, Magyarország, 2013.

Tékus V, **Horváth Á,** Botz B, Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Zs. Role of the Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) ion channel in the acute and chronic inflammatory pain models using gene-deficient mice. Joint Meeting of FEPS and the Hungarian Physiological Society, Budapest, Magyarország, 2014.

Helyes Zs, Scheich B, **Horváth Á**, Botz B, Tékus V, Czompa A, Ludmerczki R, Pintér E, Csepregi J, Mócsai A, SZolcsányi J, Mátyus P. Analgesic effects of a novel semicarbazide-sensitive amine-oxidase inhibitor in neuropathic and inflammatory pain models of the mouse. IBRO Workshop 2016, Budapest, Magyarország, 2016.

Bölcseki K, Tékus V, Scheich B, **Horváth Á**, Czompa A, Ludmerczki R, Mátyus P, Helyes Zs. A szemikarbazid-szenzitív amin oxidáz (SSAO) gátlók antihyperalgetikus hatásának és a TRPA1 ioncsatorna szerepének vizsgálata traumás neuropáthiás fájdalom állatmodelljében. Magyar Farmakológiai, Anatómus, Mikrocirkulációs és Élettani Társaságok közös tudományos konferenciája, Pécs, Magyarország, 2016.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Prof. Dr. Helyes Zsuzsannának TDK, majd PhD munkám során nyújtott rengeteg segítségét és türelmét. Fantasztikus lelkesedése, hatalmas szakmai tudása és közvetlensége nemcsak nekem, hanem mindenki számára követendő példát jelent. Köszönöm a Doktori Iskola vezetőjének és intézetvezetőnknek, Prof. Dr. Pintér Erikának, hogy lehetővé tette az intézetben végzett munkámat és köszönöm hasznos szakmai tanácsait, amelyekkel ellátott az eddig itt töltött évek során. Köszönöm Szolcsányi János Professzor Úrnak, hogy példát mutatott a kutatói pálya iránti elhivatottságból, és köszönöm Prof. Dr. Pethő Gábornak, hogy lehetővé tette oktatómunkámat. Szeretnék köszönetet mondani egykori TDK témavezetőmnek és jelenlegi kolléganőmnek, Dr. Tékus Valériának, hogy megmutatta a kutatómunka gyakorlati oldalát, és akihez nemcsak a diákkörös, hanem PhD-s éveim alatt is bármikor fordulhattam szakmai tanácsért. Köszönöm Dr. Borbély Évának, Dr. Szőke Évának, Dr. Kemény Ágnesnek, Dr. Bölcseki Katának, Dr. Boros Melindának, Dr. Pozsgai Gábornak és Dr. Scheich Bálintnak a kísérletek során nyújtott segítségüket és értékes iránymutatásaikat. Külön köszönet korábbi PhD hallgatótársamnak, Dr. Botz Bálintnak az *in vivo* képző módszerek elsajátításában nyújtott segítségéért. Nagyon hálás vagyok Perkecz Anikónak a kiváló szövettani munkájáért, illetve Gógliné Kati néniem, Ömböliné Dórinak, Bagoly Teréznek, Szentés Nikolettnek és Kiss Tamásnak a professzionális asszisztensi munkájukért. Köszönettel tartozom PhD hallgatótársaimnak, illetve a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet összes dolgozójának a vidám hétköznapiakért és a nyugodt alkotói légkör megteremtéséért. Kollaborátoraink közül köszönet illeti Csepregi Jankát és Prof. Dr. Mócsai Attilát a BxN és K/BxN szérumok biztosításáért, Prof. Dr. Mátyus Pétert és kollégáit az SSAO-gátló vegyületek szintéziséért, Dr. Zákány Rózát és Dr. Juhász Tamást a porcsejtek tenyésztéséért és metakromáziás festéséért, illetve Awt Menghist és Julie Keeplet az SSAO-gátlók hatástani vizsgálatáért CFA-indukált artritiszben. Végül szeretném megköszönni családom, különösen édesanyám és menyasszonyom végtelen türelmét és támogatását, nélkülük e dolgozat nem valósulhatott volna meg.

A kutatás az Európai Unió és Magyarország támogatásával a TÁMOP 4.2.4A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú „Nemzeti Kiválóság Program-Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program”, a GINOP-2.2.1-15-2016-00020 azonosító számú „Új, több támadáspontú innovatív fájdalomcsillapító fejlesztése: hatástani, preklinikai és humán fázis I. vizsgálatok” és a GINOP-2.3.3.-15-2016-00050 azonosító számú „PEPSYS-A peptiderg szignalizáció komplexitása és szerepe szisztémás betegségekben” című projektek keretei között valósult meg.