

Psoriasis állatkísérletes modelljének továbbfejlesztése és a Tranziens Receptor Potenciál (TRP) ioncsatornák szerepének vizsgálata psoriasis egérmodellben

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Horváth Szabina

Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ
Bőr-, Nemikórtani és Onkodermatológiai Klinika

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezetők: Prof. Dr. Gyulai Rolland, egyetemi tanár
Dr. Kemény Ágnes, egyetemi docens

Programvezető: Prof. Dr. Miseta Attila, egyetemi tanár
Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Bogár Lajos, egyetemi tanár



Pécs, 2020.

BEVEZETÉS

A pikkelysömör (psoriasis) krónikus, immun-mediált, poligénes gyulladós bőrbetegség, mely a teljes populáció 2-3%-át érinti ¹. Leggyakoribb formája a plakkos pszoriázis (psoriasis vulgaris), mely az esetek 90%-ban fordul elő ². A betegség klinikai tünetei az élesen körülhatárolt, száraz, pikkelyesen hámló gyulladt plakkok, melyek klasszikus esetben a könyök, térd, hát és a fejbőr területén jelentkeznek, de generalizálódva a test egészén megjelenhetnek. A pikkelysömörös bőrt jellegzetes szövettani elváltozások jellemzik: a keratinociták proliferációja és differenciációja, a dermis kisereinek tágulata, valamint a kifejezett granulocitás és mérsékelt T-sejtes infiltráció. Bár az egyik legszélesebb körben tanulmányozott bőrbetegség, a kialakulásának hátterében álló molekuláris mechanizmusok jelenleg sem teljesen ismertek.

A pikkelysömör patomechanizmusának vizsgálatára az egyik legáltalánosabban elfogadott állatmodellként az Aldara (5% imiquimod)-indukált bőrgyulladást alkalmazzák ³. Az imiquimod (IMQ), egy nukleotid-szerű kismolekula, mely biológiai hatását első sorban a dendritikus sejteken és makrofágokon található TLR 7 és 8 molekulákon keresztül fejti ki ⁴. Lokális alkalmazása egerek bőrén erythema, hámlás, parakeratózis, akantózis és T-sejtes infiltráció kialakulását eredményezi, valamint jól reprodukálja a humán pikkelysömör jellegzetes szövettani elváltozásait ^{5,3,6,7}. Számos előnye ellenére (költséghatékony, könnyen használható, a gyulladós reakció gyors kiváltását teszi lehetővé, kombinálható: genetikailag módosított törzseken is alkalmazható) a modellel szemben már több kritikai észrevétel is megfogalmazódott, az alkalmazásakor felmerülő nehézségek miatt. A modell egyik legnagyobb hátránya, hogy a lokális hatások mellett szisztémás gyulladós reakció is kialakul, melynek tünetei súlycsökkenés, szisztémás citokinszint emelkedés, kiszáradás, rossz közérzet és fájdalom, melyek súlyos esetben a kezelt egerek halálához is vezethetnek ^{8 9,10,11,12}.

Számos megfigyelés gyűlt össze arról, hogy az idegrendszer és az immunsejtek között a perifériás szövetekben is szoros kapcsolat áll fenn, és az érző idegek fontos szerepet játszanak az immunfolyamatok szabályozásában¹³. A szakirodalomban több olyan tanulmány is található, ahol pikkelysömörös betegeknél idegi károsodást követően a bőrtünetek egyoldali, lokális javulása vagy teljes remissziója figyelhető meg az érintett dermatóma területén ¹⁴. Abban az esetben, ha a betegek visszanyerték neurológiai funkcióikat, a bőrtünetek ismételt megjelenése volt megfigyelhető. Ellenben azoknál a betegeknél, ahol az idegi károsodás állandósult, a bőrtünetek mérséklődése volt megfigyelhető ¹⁵. Ezek a klinikai megfigyelések rávilágítottak a neuronok és neurotranszmitterek, mint fontos mediátorok szerepére a pikkelysömör kialakulásában, valamint arra, hogy a lokálisan szekretált neuropeptidok hozzájárulnak a gyulladás fenntartásához.

Az érző idegvégződéseken expresszálandó tranziens receptor potenciál (TRP) ioncsatornák aktivációja hozzájárul az idegvégződésben tárolt neuropeptidok exocitózisához. A TRP ioncsatornák

nem szelektív kationcsatornák, melyek elsődlegesen a peptiderg szenzoros neuronokon expresszálódnak¹⁶. A TRP receptorok polimodálisak, aktiválásukban fizikai (feszültség, hőmérséklet, mechanikai ingerek) és kémiai (endogén, exogén) ingerek egyaránt szerepet játszanak. Számos sejttípuson expresszálódnak a bőrben, megtalálhatóak az érző idegvégződéseken, valamint a bőr rezidens sejtjein (keratinociták, melanociták, immun/gyulladásos sejtek)¹⁷, és különféle élettani folyamatokban vesznek részt, mint az érzékelés vagy a bőr homeosztázisának szabályozása. Már több bőrbetegség esetében igazolták a TRP csatornák abnormális működését (fokozott vagy hiányos csatornaaktivitás), ilyen a krónikus fájdalom és viszketés, dermatitisz, vitiligo, alopecia, sebgyógyulás, bőr karcinogenezis és barrier funkció^{16,18,19}.

A közelmúltban Riol-Blanco és munkatársai közöltek egy publikációt, melyben a TRP ioncsatornák szerepét vizsgálták pikkelysömörben. Kísérleteik során igazolták, hogy a TRPV1⁺ szenzoros neuronok nélkülözhetetlenek az imiquimod(IMQ)-indukált psoriasiform bőrgyulladás kiváltásában. Vizsgálataik szerint a nociceptorok farmakológiai ablációját követően a dermális dendritikus sejtek (DDC-dermal dendritic cell) nem képesek IL-23 termelésre az Aldara-indukált bőrgyulladás modellben, tehát csökken a gyulladásos reakció mértéke²⁰.

Jól ismert, hogy a TRPA1⁺ nociceptorok 97%-a TRPV1-et is expresszál, míg a TRPV1⁺ nociceptorok 30%-a a TRPA1 receptort is expresszálja²¹. A bőrben nem csak az érző idegvégződéseken, hanem a nem-neurális sejteken (keratinociták, melanociták, immun/gyulladásos sejtek) is kimutatták expressziójukat^{17,22,23}.

CÉLKITŰZÉS

I. Aldara-indukált psoriasiform dermatitisz modell továbbfejlesztése Finn kamrák alkalmazásával

A szisztémás hatások direkt vagy indirekt módon befolyásolhatják a különböző vizsgálatok során kapott eredményeket. Jelenleg nem áll rendelkezésre olyan állatmodell a pikkelysömör vizsgálatára, amely kiküszöbölne a szisztémás mellékhatások kialakulását. Feltételezéseink szerint a szisztémás hatások mérséklésével egy még specifikusabb modellt tudunk létrehozni, amely lehetővé teszi a gyulladásos folyamat azon aspektusainak vizsgálatát, amelyre a klasszikus IMQ modellben, annak limitáló tényezői miatt nem volt lehetőség. Így munkánk során célul tűztük ki:

1. Finn kamrák alkalmazásával az Aldara-indukált psoriasiform bőrgyulladás modell továbbfejlesztését.

II. TRPA1 és TRPV1 receptorok szerepének vizsgálata Aldara-indukált psoriasiform bőrgyulladásban

Jelenleg nem rendelkezünk információval a TRPA1 receptorok szerepéről pikkelysömörben, viszont ezeknek a receptoroknak a patogenetikai szerepe jól ismert krónikus viszketéssel járó kórképekben, illetve korábban igazolták, hogy a TRPA1 jelenléte a nociceptorokon szükséges az allergiás kontakt

dermatitisz kialakulásához. Mindezek alapján azt feltételezzük, hogy a TRPA1 receptorok szerepet játszhatnak a psoriasis patogenezisében. Hipotézisünket a Finn kamrák alkalmazásával továbbfejlesztett IMQ-indukált psoriasiform dermatitisz egérmódeljében vizsgáltuk meg. Ezek alapján munkánk során az alábbi célokat tűztük ki:

1. A TRPA1 és TRPV1 ioncsatorna szerepének vizsgálata a Finn kamrák alkalmazásával továbbfejlesztett Aldara-indukált psoriasiform bőrgyulladás egérmódeljében genetikailag módosított egerek felhasználásával.
2. *In vitro* kísérletek segítségével annak vizsgálatát, hogy az imiquimod képes-e közvetlenül aktiválni a sejtek TRPA1 és TRPV1 ioncsatornáit.

MÓDSZEREK

Kísérleti állatok

Kísérleteinkben TRPA1, TRPV1, TRPA1/V1 génhianyos (KO, ^{-/-}) és vad típusú (WT, ^{+/+}), valamint C57BL/6J 20-25 g-os, 8-10 hetes nőstény egerekkel dolgoztunk (n=30/csoport), amelyeket a Pécsi Tudományegyetem Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetének állatházában tenyésztettünk és tartottunk 24-25°C-on, patogénmentes körülmények között, normál rágcsáló táppal és vízzel *ad libitum* ellátva. Kísérleteink minden esetben megfeleltek az állatok védelmére és kíméletére vonatkozó 1998/XXVIII. számú törvény, valamint az állatkísérletek végzéséről szóló 243/1998. számú kormányrendelet előírásainak. A kísérleti eljárásokat a Pécsi Tudományegyetem állatkísérletekkel foglalkozó Etikai Bizottsága engedélyezte (engedélyszám: BA 02/2000-2/2012, BA 02/2000-36/2017).

Psoriasiform bőrgyulladás kiváltása

A psoriasiform bőrgyulladást Aldara (5% imiquimod, Meda Pharma, Magyarország) krémmel indukáltuk, míg kontrollként vazelint alkalmaztunk az 5 napos kísérlet első négy (0., 1., 2., 3.) napján. Az egerek hátbőrét 1 nappal az első kezelés előtt elektromos borotvával és epiláló (Veet) krémmel szőrtelenítettük. A dolgozatomban bemutatott kísérletek során két különböző kísérleti elrendezést alkalmaztunk a psoriasiform bőrgyulladás kiváltására. Az eredeti protokoll (OP: original protocol) szerint - melyet *van der Fits* és munkatársai írtak le 2009-ben - 62,5 mg Aldarával (5% imiquimod), míg a kontroll csoportban 62,5 mg vazelinnel kezeltük az egerek leborotvált hátbőrét ³. Az általunk módosított protokoll (MP: modified protocol) során 25 mg Aldarát és 25 mg vazelint helyeztünk két külön Finn kamra (FinnChamber on Scanpor, SmartPractice, USA) segítségével ugyanazon egér hátbőrére. A módosított protokoll során a kísérlet minden napján fokozottan figyeltünk arra, hogy ugyanazt a bőrterületet kezeljük a krémekkel. Az összes kísérleti procedúra esetében az altatást ketaminnal (100 mg/kg i.p., Richter, Magyarország) és xylazinnal (5 mg/kg i.p., Lavet, Magyarország) végeztük. A kísérlet végén (4. nap) az altatott állatokat cervikális diszlokációval leöltük. A hátbőr

szöveteket, lép szövetet, hátsó gyöki ganglion (DRG) mintákat és perifériás vérmintákat a további felhasználástól függően 6%-os formalinban fixáltuk vagy -80 °C-on tároltuk.

Hátbőr duzzadás (ödéma) mértékének meghatározása

A hátbőr vastagságát mikrométerrel (Moore and Wright, Sheffield, Anglia) mértük 0,1 mm pontossággal a kezelés megkezdése előtt (0. nap, kontroll mérés), valamint a kezelést követően a kísérlet minden napján (1. nap, 2. nap, 3. nap, 4. nap) a kezelt területeken. Az adatokat a hátbőr vastagság %-os változásában adtuk meg a kezelés megkezdése előtt mért kontroll értékekhez viszonyítva.

A bőrszövet perfúziójának mérése

A hátbőr vérátáramlásának nyomon követését valós idejű lézer Dopplerrel, úgynevezett LASCA (LAsER Speckle Contrast Analysis - PeriCam PSI System; Perimed, Svédország) módszerrel végeztük ²⁴, ²⁵. A lemért területeket (ROI – region of interest) a kezelési területeknek megfelelően jelöltük ki. A kezelt területek átlagos perfúziós értékét a PimSoft szoftver (Perimed, Svédország) segítségével számítottuk ki. Az adatokat a kontroll értékekhez (0. nap, a kísérlet megkezdése előtti átlagos perfúzió) viszonyítva százalékos változásban adtuk meg.

A hámlás pontozása

Az egerek Aldarával vagy vazelinnel kezelt bőrterületét a kísérlet minden napján 3 szakképzett bőrgyógyász szakorvos értékelte, akik nem ismerték a kísérleti protokollokat. A hámlás pontozása 0-tól 4-ig terjedő skálán történt, a következő szempontok szerint: 0 - tünetmentes, 1 - enyhe, 2 - mérsékelt, 3 - jellegzetes, 4 – maximális.

Lépmegnagyobbodás vizsgálat

A kezelés során kialakuló szisztémás mellékhatások vizsgálata céljából a kísérlet utolsó napján (4. nap) az állatok lépszövetét eltávolítottuk és lemértük a tömegét. Ezt követően a kapott értékeket csoportonként egymáshoz viszonyítva adtuk meg.

Radioaktív ⁴⁵Ca²⁺ izotóp felvétel és Ca²⁺ beáramlás vizsgálat

Az imiquimod hatására bekövetkező ⁴⁵Ca²⁺ izotóp felvételt és Ca²⁺ beáramlást szcintillációs számlálóval vagy áramlási citometriával határoztuk meg HaCaT (humán immortalizált keratinocita), TRPA1 vagy TRPV1 receptor-expresszáló CHO (chinese hamster ovary) sejteken^{26,27}

Génexpressziós vizsgálatok

Az első kezelést követő 6. és 48. (2. nap) órában kezeletlen, vazelinnel és Aldarával kezelt hátbőr szövetminták vettünk (n=5) és kvantitatív valós idejű PCR vizsgálattal meghatároztuk az IL-1 β , TNF- α , IL-17A, IL-23 és IL-22 citokinek mRNS expresszóját²⁸. A kísérlet 4. napján, az utolsó Aldara vagy vazelin

kezelést követően 24 órával DRG mintákat gyűjtöttük és meghatároztuk az Iba-1 mRNS expresszió mértékét.

Gyulladásos citokin fehérjék meghatározása ELISA módszerrel

Az első Aldara kezelés után 6 órával perifériás vérmintákat gyűjtöttünk és ELISA módszer segítségével meghatároztuk a TNF- α , IL-1 β és interferon alfa (IFN- α) gyulladásos citokinek koncentrációját.

Szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatok

A vazelinnel és Aldarával kezelt hátbőr szöveteket 6%-os formalinban fixáltuk. A paraffinba ágyazott mintákból 5 μ m-es metszeteket készítettünk és hematoxilin-eozinnal vagy kloroacetát-észterázzal festettük a gyulladás általános szövettani elváltozásainak megállapítása céljából. Immunhisztokémiai vizsgálatainkhoz a következő elsődleges antitesteket használtuk: nyúl monoklonális anti-egér CD4 (ab183685, Abcam, Cambridge, UK; hígítás: 1:1000); nyúl poliklonális anti-egér TRPV1 (ab31895, Abcam, Cambridge, UK; hígítás: 1:1000); nyúl poliklonális anti-egér TRPA1 (ab68847, Abcam, Cambridge, UK; hígítás: 1:300); nyúl poliklonális anti-egér Ki-67 (AB9260, EMD Millipore Corporation, Temecula, CA, USA; hígítás: 1:250) és nyúl poliklonális anti-egér CD11b (NB110-89474, Novus Biologicals, CO 80112, USA; hígítás: 1:400).

Statisztikai analízis

A kapott adatokat átlagoltuk, az átlagtól való standard eltérést (S.E.M) is feltüntettük. Az elemzéseket a GraphPad Prism 7 szoftverrel (GraphPad Software, USA) végeztük. Minden esetben * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

1. Aldara-indukált psoriasiform dermatitisz modell továbbfejlesztése Finn kamrák alkalmazásával

A pikkelysömör klinikai tünetei hasonló mértékben jelennek meg az MP és az OP csoportban Aldara kezelés hatására

A pikkelysömör klinikai tünetei, a bőrpír és hámlás mindkét módszer esetében megfigyelhető volt az Aldara kezelt bőrterületeken, míg a vazelin kezelt területeken nem. Az OP és az MP csoportban is szignifikáns mértékben emelkedett az Aldara-kezelt területek vérátáramlása és hámlása a kontrollhoz képest, viszont a két módszer között nem detektáltunk különbséget. A hátbőr duzzadás mértéke Aldara kezelés hatására szignifikánsan magasabb volt az MP csoportban az OP csoporthoz képest a kísérlet minden napján.

Egyenértékű hisztopatológiai elváltozások Aldara kezelés hatására az OP és MP csoportban

Mindkét kísérleti csoport Aldara kezelt bőrmintáiból készített szövettani metszeteken megfigyelhetők a pikkelysömörre jellemző hisztopatológiai elváltozások: keratinocita hyperproliferáció, hyperkeratózis, parakeratózis, Munro-féle mikroabszcesszusok, valamint dilatált kapillárisok és T-sejtes infiltráció a bőr dermális régiójában. A metszeteket a Munro-féle mikroabszcesszusok száma és az epidermisz vastagsága alapján értékeltük, mely során nem detektáltunk szignifikáns különbséget az OP és az MP csoport Aldara-kezelt bőrmintái között. A Ki-67⁺ sejtek eloszlása azonos volt a két kezelési csoportban Aldara kezelést követően, valamint a CD11b⁺ sejtek számának az emelkedése volt megfigyelhető Aldara kezelés hatására az OP és az MP csoportban egyaránt.

Az MP csoportban csökkent a szisztémás gyulladós válasz

Már az első Aldara kezelést követően testsúly csökkenés volt megfigyelhető az OP és az MP csoportban a vazelinrel kezelt OP csoporthoz képest, és ez a különbség egészen a kísérlet végéig fennállt. Az MP csoportban szignifikáns mértékben kisebb volt a súlycsökkenés az Aldara-kezelt OP csoporthoz képest a kísérlet 1., 2. és 3. napján. A lép megnagyobbodásának mértéke az Aldara-kezelt OP csoportban volt a legnagyobb, míg ehhez képest a Finn kamrák alkalmazásával továbbfejlesztett protokoll használatával szignifikáns mértékben csökkent. Az MP csoport és a kontroll, vazelin-kezelt OP csoport léptömege között nem detektáltunk szignifikáns eltérést. Az első Aldara kezelést követően 6 órával levett perifériás vérmintákban meghatároztuk az IFN- α , IL-1- β és a TNF- α koncentrációját. Mindhárom citokin esetében az a tendencia volt megfigyelhető, hogy a koncentrációk alacsonyabbak voltak az MP csoport plazma mintáiban az Aldara-kezelt OP csoporthoz képest. Viszont míg ez a különbség az IFN- α és az IL-1 β esetén szignifikánsnak bizonyult, addig a TNF- α esetén nem. Az MP csoport és a vazelin-kezelt OP csoport között nem detektáltunk szignifikáns eltérést egyik citokin koncentrációjának mérése során sem.

2. TRPA1 és TRPV1 receptor szerepének vizsgálata Aldara-indukált psoriasiform bőrgyulladásban

Fokozott gyulladós válasz TRPA1 receptor hiányában

Első lépésként TRPA1 vad típusú és génhányos egerek hátbőrén váltottuk ki az MP módszert alkalmazva a psoriasiform bőrgyulladást. Az 5 napos kísérlet minden napján vizsgáltuk a gyulladás során kialakuló ödéma mértékét, a kezelt területek szöveti perfúzióját és a hámlás mértékét. Azt tapasztaltuk, hogy az imiquimod kezelés jelentős bőr infiltrációt, vérátáramlás emelkedést és fokozott hámlást eredményezett a TRPA1 WT és KO törzsekben egyaránt. Meglepő módon az összes klinikai paraméter esetében magasabb gyulladós aktivitást detektáltunk a TRPA1 KO törzsből a vad típusúhoz képest.

Fokozott psoriasiform bőrgyulladás szövettani jelei TRPA1 receptor hiányában

Az Aldara kezelés hatására kialakuló hátbőr gyulladás szövettani képén TRPA1 WT és KO törzsek esetében is megfigyelhetők voltak a pikkelysömörös bőr jellegzetes hisztopatológiai elváltozásai: keratinociták hiperproliferációja, parakeratózis, hiperkeratózis, Munro-féle mikroabszcesszusok megjelenése. A metszeteket szemikvantitatív módon pontoztuk három paraméter, az epidermisz átmérője, a Munro-féle mikroabszcesszusok száma és a dilatált kapillárisok száma alapján. Az összesített szövettani pontszám meghatározása után a TRPA1 WT és KO törzsek Aldara-indukált bőrgyulladásának szövettani képe között szignifikáns eltérést detektáltunk, mely alapján a TRPA1 KO törzsben fokozottabb volt a psoriasiform elváltozás. A gyulladásos sejtek beszűrődésének vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a vazelinnel kezelt kontroll mintákhoz képest Aldara kezelést követően emelkedett a neutrofil granulociták és CD4⁺ sejtek száma a dermiszben, viszont a két törzs között nem detektáltunk különbséget.

Fokozott gyulladásos citokin mRNS expresszió a TRPA1 KO egerekben

Meghatároztuk az IL-1 β , TNF- α , IL-23, IL-17A és IL-22 citokinek mRNS expresszióját a kezelés különböző időpontjaiban (első Aldara és vazelin kezelést követő 6. és 48. órában) levett TRPA1 WT és TRPA1 KO csoportok bőrmintáiban. Az IL-1 β , TNF- α és IL-22 citokinek mRNS mennyisége Aldara kezelés hatására a TRPA1 KO egerekben már 6 órával az első kezelést követően jelentősen megnőtt és szignifikáns eltérést mutatott a vad típushoz képest, maximumukat a 48 órás időpontban érték el. A két törzs IL-17A mRNS expressziója a 48 órás mintavételi időpontban érte el a maximumát, mely a TRPA1 KO törzsben szignifikánsan magasabb volt a vad típushoz képest. Az IL-23 expressziója a 6 órás időpontban még a TRPA WT törzsben volt fokozottabb a KO törzshöz képest, majd az első Aldara kezelés után 48 órával már a KO törzsben mértünk magasabb expressziós szintet. A kísérlet végére az összes citokin koncentrációja lecsökkent a kiindulási értékekre.

Csökkent gyulladásos válasz TRPV1 receptor hiányában

Vizsgálataink során TRPV1 vad típusú és génhányos egereken is kiváltottuk Aldarával a pikkelysömör-szerű bőrreakciót. Az öt napos kísérlet minden napján monitoroztuk az imiquimod kezelés hatására kialakuló bőrvastagság, szöveti vérátáramlás és hámlás mértékét a kezelt területeken. Vizsgálataink azt mutatták, hogy az Aldarával kiváltott gyulladásos reakció mértéke fokozottabb volt a TRPV1 WT törzsben a KO törzshöz képest.

A TRPV1 hatása a TRPA1 receptor szerepére az IMQ-indukálta bőrgyulladásban

TRPV1/TRPA1 kettős KO egereken is kiváltottuk az imiquimod-indukált psoriasiform bőrgyuladást és kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy TRPV1/TRPA1 KO egerekben csökkent a gyulladás során

kialakuló bőrvastagság és vérátáramlás mértéke a vad típushoz képest. Ezen eredményeink hasonló tendenciát mutattak, mint amit a TRPV1 KO egereknél indukált gyulladás során tapasztaltunk.

Az imiquimod közvetlenül aktiválja a TRPA1 ioncsatornákat

TRPA1 receptor-expresszálo és TRPV1 receptor-expresszálo CHO sejtvonalakon, valamint HaCaT sejteken vizsgáltuk meg, hogy az imiquimod képes-e közvetlenül aktiválni a sejtek TRPA1, illetve TRPV1 ioncsatornáit. Méréseink azt mutatták, hogy imiquimod hatására radioaktív $^{45}\text{Ca}^{2+}$ izotóp felvétel figyelhető meg a TRPA1 receptor-expresszálo CHO sejteken, viszont a TRPV1⁺ CHO sejteken nem. Ezzel szemben HaCaT sejtek esetén kismértékű $^{45}\text{Ca}^{2+}$ izotóp felvétel volt detektálható imiquimod hatására. Áramlási citometriás kísérletek során igazoltuk, hogy az imiquimod dóziszfüggő Ca^{2+} beáramlást okoz TRPA1⁺ CHO sejtekben és ez a válasz gátolható szelektív TRPA1 antagonistákkal (A967079, HC030031).

A TRPA1 expresszálódik a CD4⁺ sejteken, míg a TRPV1 nem

Immunhisztokémiai vizsgálataink során kimutattuk, hogy vannak olyan CD4⁺ sejtek a bőrben, amelyek a TRPA1 receptort is expresszálják, viszont TRPV1 és CD4 ko-lokalizációt nem detektáltunk.

Fokozott Iba-1 mRNS expresszió Aldara kezelés hatására TRPA1 KO egerek DRG mintáiban

Aldara kezelés hatására a kísérlet 4. napján az *Iba-1* makrofág aktivációs marker relatív expressziója háromszor nagyobb volt a TRPA1 KO egerek DRG mintáiban, mint a kezeletlen és TRPA1 WT egerek DRG mintáiban.

MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

Napjainkban az egyik legáltalánosabban használt kísérletes állatmodell a pikkelysömör patomechanizmusának vizsgálatára az Aldara-indukált psoriasiform bőrgyulladás egérben. A modell népszerűsége abban rejlik, hogy könnyen használható, költséghatékony, a gyulladásos reakció gyors (5-7 nap alatti) kiváltását teszi lehetővé és speciális genetikai háttérű egértörzsekben is alkalmazható. Azonban előnyei mellett a modell jelentős hátrányokkal is rendelkezik. A szakirodalomban számos olyan publikáció található, amelyben az imiquimoddal kezelt egereknél lépmegnagyobbodás, jelentős súlyvesztés, súlyos dehidráció és szisztémás gyulladás (emelkedett gyulladásos citokinek a vérben) kialakulását figyelték meg^{3,29,11,30}. Ezen eredmények egyértelműen alátámasztják, hogy az imiquimod lokális alkalmazása egereknél szisztémás mellékhatások kialakulását eredményezi, mely a modell legnagyobb hátrányát okozza. Ezeket a szisztémás mellékhatásokat az imiquimod modell alkalmazása során mért értékek értelmezésekor nagyon gyakran figyelmen kívül hagyják, annak ellenére, hogy jelentősen befolyásolhatják a kapott eredményeket. A kiszáradás a bőr szerkezetének megváltozását eredményezi, mely során sokkal vékonyabbá és fesesebbé válik a bőr. A dehidráció jelentősen befolyásolja a bőr barriert és az immunológiai funkciókat.

A szisztémás tünetek kialakulásában több tényező játszik szerepet. Egyrészt az imiquimoddal kezelt terület mérete, ugyanis a klasszikus IMQ modellben a teljes hátbőr kezelése történik IMQ-al, amely az egér teljes testfelszínének 15 %-át érinti³¹. Az ilyen nagy területet érintő imiquimod kezelés a szervezet általános állapotának romlását eredményezheti, melyet embereknél is megfigyeltek^{32,33}. Másrészt az egerek tisztálkodásuk során az imiquimodot könnyen lenyelhetik, mely a szervezetbe bejutva I. típusú IFN-ok termelődését eredményezi a bélrendszerben, ami hozzájárul a szisztémás hatások kialakulásához.

Munkánk első részében Finn kamrák alkalmazásával továbbfejlesztettük *van der Fits* és munkatársai által elsőként alkalmazott imiquimod-indukált psoriasiform bőrgyulladás modellt. Ez az új technika alkalmasnak bizonyult a psoriasiform bőrreakció kiváltására, melynek gyulladós tünetei (ödéma, sejtes infiltráció, hámlás, vérátáramlás, hisztopatológiai elváltozások) hasonló mértékben jelentek meg, mint a klasszikus imiquimod modellben. A módszer használatával csökkennek a szisztémás mellékhatások, mivel jelentősen kisebb a lépmegnagyobbodás és súlyvesztés mértéke, valamint a gyulladós citokinek (IL-1 β , TNF- α , IFN- α) mennyisége a vérben. Azt feltételezzük, hogy a szisztémás válasz csökkenése a kisebb méretű kezelt területnek és ezáltal a kevesebb krémnek köszönhető, valamint annak, hogy Finn kamrák alkalmazásával a kezelések fedett bőrterületen történnek, ezáltal elkerülhető, hogy az egerek tisztálkodásuk során lenyeljék az IMQ-ot. Az új eljárás további előnye, hogy a vazelin és az Aldara kezelés ugyanazon az állaton, önkontrollos módon történik. Ennek köszönhetően csökken az állatok közötti különbségek valószínűsége, valamint még költséghatékonyabbá válik a modell. Továbbá a módszer lehetővé teszi az Aldara hosszútávú alkalmazásával az elhúzódó gyulladós állapot tanulmányozását. Ezáltal hozzájárulhat az IMQ modell továbbfejlesztéséhez, a betegség krónikus gyulladós állapotának részletesebb megismeréséhez és a psoriasis társbetegségeinek tanulmányozásához. Kísérleti megközelítésünket más állatmodellekben alkalmazva megelőzhető vagy mérsékelhető a helyileg alkalmazott hatóanyagok (TPA, aceton) szisztémás mellékhatásainak kialakulása.

Munkánk második részében az előzőekben bemutatott, Finn kamrák alkalmazásával továbbfejlesztett (MP módszer) Aldara-indukált psoriasiform bőrgyulladás lokalizált modelljében, különböző génihiányos egerek (TRPV1 KO, TRPA1 KO és TRPV1/TRPA1 kettős KO) felhasználásával vizsgáltuk a TRP receptorok szerepét.

TRPV1 KO egereken a gyulladós reakció kiváltását követően hasonló eredményeket kaptunk, mint amit *Riol-Blanco* és munkatársai figyeltek meg az RTX kezelt egereknél. Ezen eredményeink alapján feltételezhető, hogy a TRPV1 receptorok jelenléte az idegvégződéseken nélkülözhetetlen az imiquimod-indukált gyulladós reakció kiváltásában. A TRPV1 receptor-expresszázó CHO sejtvonalon végzett *in vitro* kísérleteink során ugyanakkor kimutattuk, hogy az imiquimod nem képes közvetlenül aktiválni a TRPV1 receptort. Így azt feltételezzük, hogy a TRPV1 aktiválásáért egy eddig ismeretlen

mediátor a felelős, mely imiquimod hatására szabadul fel más sejtekből (pl. keratinocitákból). Ezt követően TRPV1/TRPA1 kettős KO egerek esetén vizsgáltuk a psoriasiform bőrgyulladás mértékét, mely során azt tapasztaltuk, hogy a két receptor együttes hiánya nem befolyásolta jelentősen a TRPV1 KO egereknél megfigyelt bőrgyulladást, ami tovább erősíti azt a feltételezést, mely szerint a TRPV1 domináns szerepet játszik a folyamatban.

Meglepő módon kísérleteink során a TRPA1 génhányos egereknél imiquimod kezelés hatására fokozott Th1-típusú immunválaszt, bőrvastagság növekedést, vérátáramlás emelkedést és súlyosabb pikkelysömörös tüneteket tapasztaltunk, mint a TRPA1 receptort expresszáló csoportban. Ez arra utal, hogy normál körülmények között a TRPA1 a gyulladós folyamat csökkentésében játszik szerepet. Vizsgálataink során emelkedett *Iba-1* (makrofág aktivációs marker) mRNS expressziót detektáltunk TRPA1 KO egerek DRG mintáiban a vad típushoz képest. Ezen eredményeink alapján feltételezhető, hogy a TRPA1 ioncsatorna neuronális expressziója szabályozza az imiquimod által indukált idegaktivitást.

Egyre több közlemény számol be arról, hogy a TRPA1 és TRPV1 heteromer csatornát képezhet a szenzoros neuronokon, s ezáltal képesek szabályozni egymás aktivitását (szenzitizáció/deszzenzitizáció) a gyulladás során³⁴. Fischer és munkatársai vizsgálata szerint a TRPA1 jelenléte funkcionális gátlást gyakorol a TRPV1-re³⁵. Ezáltal feltételezhető, hogy a TRPA1 képes befolyásolni a szenzoros neuronok ingerlékenységét a TRPV1 aktivitásának szabályozása révén. Bár a TRPA1 aktiváción keresztül létrejövő gyulladáskeltő hatás jól ismert, egyre több kutatási eredmény igazolja a receptor védő hatását a gyulladós folyamatokban. A közelmúltban sebgyógyulás kísérletes egérmodelljében írták le, hogy bőrben a TRPA1⁺ nociceptorok farmakológiai aktiválása csökkenti a hegeképződést és elősegíti a szöveti regenerációt³⁶. Kolitisz kísérletes egérmodelljében korábban azt feltételezték, hogy a kapszazepin gyulladásgátló hatását a TRPV1 gátlásán keresztül fejti ki, viszont a közelmúltban igazolták, hogy ez a hatás a TRPA1 deszenzitizációja révén valósul meg³⁷. Tehát inkább a TRPA1 agonizmus a kulcsfontosságú, mintsem a TRPV1 gátlása a kolitisz kialakulásával szemben. Ezen kívül a kolitisz különböző kísérletes egérmodelljében kimutatták, hogy a TRPA1 genetikai hiánya fokozza a gyulladós reakció mértékét^{38,39}.

Jól ismert az IMQ hatásmechanizmusával kapcsolatban, hogy biológiai hatását egerek bőrében a makrofágok és dendritikus sejtek TLR7 molekuláin keresztül fejti ki⁴. Azonban nem csak TLR7-en keresztül képes kifejteni a hatását, hanem a NALP 3 jelátviteli útvonalon keresztül is indukál inflammaszóma aktivációt, valamint ligandja lehet az adenzin-receptoroknak, melyekre antagonistaként hat^{40,41}. Vizsgálataink során elsőként igazoltuk, hogy az IMQ TRPA1 agonista aktivitással is rendelkezik. *In vitro* kísérleteink során kimutattuk, hogy az imiquimod dóziszfüggő Ca²⁺ beáramlást indukál TRPA1 receptor-expresszáló CHO sejteken, amelyet szelektív TRPA1 antagonisták (A967079 és HC030031) alkalmazásával gátolni tudtunk. Ezzel szemben az IMQ nem indukált Ca²⁺

beáramlást TRPV1 receptor-expresszálló CHO sejteken. Ezen eredményeink alapján feltételezhető, hogy az IMQ nem képes közvetlenül aktiválni a TRPV1⁺ nociceptorok működését a bőrben. Ellenben, mint TRPA1 agonista képes közvetlenül aktiválni a neurális és nem-neurális sejtek TRPA1 ioncsatornáit és gyulladásgátló hatást kifejteni a bőrben.

Jól ismert, hogy a gyulladással mediátorok több útvonalon keresztül képesek szabályozni a TRPV1 ioncsatornák aktivációját, mint pl. specifikus G fehérje kapcsolt receptorokon (GPCR) vagy receptor tirozin kinázokon (RTK) keresztül³⁴. A pikkelysömör egyik kísérletes egérmodelljének a KC-Tie2-nek a jellegzetessége a bőr fokozott beidegzettség. Ebben a modellben a bőr sebészi denervációját követően csökkent a dendritikus sejtek száma, az IL-23 citokin expressziója, a T sejt infiltráció és az akantózis mértéke a bőrben, tehát a gyulladással reakció mértékének csökkenését eredményezte. Ezért a hatásért az érző idegvégződésekből felszabaduló SP és CGRP a felelős⁴². Kísérleteinkben a TRPA1 KO egerekben észlelt fokozottabb gyulladás magyarázatául szolgálhat, hogy a kapszazepinhez hasonlóan az IMQ is képes közvetlenül aktiválni a TRPA1 receptorokat az érző neuronokon, ami ezen nociceptorok TRP-mediált részleges deszenzitizációjához vezethet pikkelysömörben. Ennek eredményeképpen csökken az érző idegvégződésekből felszabaduló neuropeptid mennyisége, melynek hatására csökken a dendritikus sejtek aktivációja, így az IL-12 és IL-23 citokinek mennyisége, amely befolyásolja a Th1 és Th17 sejtek proliferációját és differenciációját, így a bőrgyulladás mértékének csökkenéséhez vezet. Mivel egyre több információval rendelkezünk a nociceptorok TRPA1 közvetített deszenzitizációjának gyulladásgátló szerepéről különböző gyulladással betegségekben, így a jövőben a már ismert vagy új „TRPA1 deszenzitizálók” alkalmazása ígéretes terápiás lehetőség lehet.

Összefoglalva, eredményeink a neuro-immun szabályozás újabb aspektusára világítanak rá. Feltehető, hogy a különböző TRP csatornák aktiválása eltérő módon befolyásolja a kialakuló immunreakciókat az adott szövetben, így a TRP csatornák fontos szerepet játszanak a szövetspecifikus immunreakciók finomhangolásában. A TRP csatornák specifikus aktiválása vagy gátlása új célpont lehet a bőr immun-mediált betegségeinek kezelésében.

ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Finn kamrák alkalmazásával továbbfejlesztettük az imiquimod-indukált psoriasiform dermatitisz egérmodelljét. Az így létrehozott lokalizált modellben szignifikáns mértékben csökkentek a szisztémás hatások, emellett lehetővé vált az Aldara és a kontroll krém hatásainak vizsgálata ugyanazon az állaton, önkontrollos módon. A módszer lehetővé teszi az Aldara hosszútávú alkalmazásával az elhúzódó gyulladással állapot tanulmányozását. Ezáltal hozzájárulhat a betegség krónikus gyulladással állapotának részletesebb megismeréséhez és a psoriasis társbetegségeinek tanulmányozásához.

2. Elsőként írtuk le a TRPA1 ioncsatorna szerepét az imiquimoddal kiváltott psoriasiform dermatitiszben.
3. Elsőként írtuk le, hogy az imiquimod TRPA1 agonista, tehát képes közvetlenül aktiválni a TRPA1 receptort, míg a TRPV1-et nem.
4. Igazoltuk, hogy TRPV1 KO egereknél hasonló mértékű gyulladás váltható ki imiquimod kezelés hatására, mint RTX kezelést követően. Ezek alapján feltételezhető, hogy a TRPV1⁺ nociceptorok jelenléte nélkülözhetetlen az imiquimod-indukált gyulladásos reakció kiváltásában.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Griffiths, C. E. M. *et al.* The global state of psoriasis disease epidemiology: a workshop report. in *British Journal of Dermatology* **177**, e4–e7 (Blackwell Publishing Ltd, 2017).
2. Griffiths, C. E. & Barker, J. N. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet* **370**, 263–271 (2007).
3. van der Fits, L. *et al.* Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J. Immunol.* **182**, 5836–5845 (2009).
4. Hemmi, H. *et al.* Small-antiviral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* **3**, 196–200 (2002).
5. Chamcheu, J. C. *et al.* Upregulation of PI3K/AKT/mTOR, FABP5 and PPAR β/δ in Human Psoriasis and Imiquimod-induced Murine Psoriasiform Dermatitis Model. *Acta Derm. Venereol.* **96**, 854–6 (2016).
6. Grine, L., Dejager, L., Libert, C. & Vandebroucke, R. E. Dual Inhibition of TNFR1 and IFNAR1 in Imiquimod-Induced Psoriasiform Skin Inflammation in Mice. *J. Immunol.* **194**, 5094–102 (2015).
7. Vinter, H. *et al.* Tumour necrosis factor- α plays a significant role in the Aldara-induced skin inflammation in mice. *Br. J. Dermatol.* **174**, 1011–21 (2016).
8. Alvarez, P. & Jensen, L. E. Imiquimod Treatment Causes Systemic Disease in Mice Resembling Generalized Pustular Psoriasis in an IL-1 and IL-36 Dependent Manner. *Mediators Inflamm.* **2016**, 5–8 (2016).
9. Hawkes, J. E., Gudjonsson, J. E. & Ward, N. L. The Snowballing Literature on Imiquimod-Induced Skin Inflammation in Mice: A Critical Appraisal. *J. Invest. Dermatol.* 1–4 (2016). doi:10.1016/j.jid.2016.10.024
10. Swindell, W. R. *et al.* Imiquimod has strain-dependent effects in mice and does not uniquely model human psoriasis. *Genome Med.* **9**, 24 (2017).
11. Grine, L. *et al.* Topical imiquimod yields systemic effects due to unintended oral uptake. *Sci. Rep.* **6**, 20134 (2016).
12. Luo, D.-Q., Wu, H.-H., Zhao, Y.-K., Liu, J.-H. & Wang, F. Original Research: Different imiquimod creams resulting in differential effects for imiquimod-induced psoriatic mouse models. *Exp. Biol. Med.* **241**, 1733–1738 (2016).
13. Andersson, U. & Tracey, K. J. Neural reflexes in inflammation and immunity. *J. Exp. Med.* **209**, 1057–1068 (2012).

14. Keçici, A. S., Göktay, F., Tutkavul, K., Güneş, P. & Yaşar, Ş. Unilateral improvement of nail psoriasis with denervation injury. *Clin. Exp. Dermatol.* **43**, 339–341 (2018).
15. Zhu, T. H. *et al.* The Role of the Nervous System in the Pathophysiology of Psoriasis: A Review of Cases of Psoriasis Remission or Improvement Following Denervation Injury. *American Journal of Clinical Dermatology* **17**, 257–263 (2016).
16. Caterina, M. J. & Pang, Z. TRP channels in skin biology and pathophysiology. *Pharmaceuticals* **9**, (2016).
17. Valdes-Rodriguez, R., Kaushik, S. B. & Yosipovitch, G. Transient receptor potential channels and dermatological disorders. *Curr. Top. Med. Chem.* **13**, 335–43 (2013).
18. Oh, M.-H. *et al.* TRPA1-Dependent Pruritus in IL-13-Induced Chronic Atopic Dermatitis. *J. Immunol.* **191**, 5371–5382 (2013).
19. Cevikbas, F. *et al.* A sensory neuron-expressed IL-31 receptor mediates T helper cell-dependent itch: Involvement of TRPV1 and TRPA1. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**, 448-460.e7 (2014).
20. Riol-Blanco, L. *et al.* Nociceptive sensory neurons drive interleukin-23-mediated psoriasiform skin inflammation. *Nature* **510**, 157–61 (2014).
21. Story, G. M. *et al.* ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **112**, 819–829 (2003).
22. Denda, M. & Tsutsumi, M. Roles of transient receptor potential proteins (TRPs) in epidermal keratinocytes. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* **704**, 847–860 (Adv Exp Med Biol, 2011).
23. Bodó, E. *et al.* Vanilloid receptor-1 (VR1) is widely expressed on various epithelial and mesenchymal cell types of human skin [4]. *Journal of Investigative Dermatology* **123**, 410–413 (2004).
24. Banki, E. *et al.* The selective PAC1 receptor agonist maxadilan inhibits neurogenic vasodilation and edema formation in the mouse skin. *Neuropharmacology* **85**, 538–47 (2014).
25. Pozsgai, G. *et al.* The role of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor activation in hydrogen-sulphide-induced CGRP-release and vasodilation. *Eur. J. Pharmacol.* **689**, 56–64 (2012).
26. Szoke, E. *et al.* Effect of lipid raft disruption on TRPV1 receptor activation of trigeminal sensory neurons and transfected cell line. *Eur. J. Pharmacol.* **628**, 67–74 (2010).
27. Sándor, Z., Varga, A., Horváth, P., Nagy, B. & Szolcsányi, J. Construction of a stable cell line uniformly expressing the rat TRPV1 receptor. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **10**, 499–514 (2005).
28. Sághy, É. *et al.* TRPA1 deficiency is protective in cuprizone-induced demyelination-A new target against oligodendrocyte apoptosis. *Glia* **64**, 2166–2180 (2016).
29. Hawkes, J. E., Gudjonsson, J. E. & Ward, N. L. The Snowballing Literature on Imiquimod-Induced Skin Inflammation in Mice: A Critical Appraisal. *J. Invest. Dermatol.* **137**, 546–549 (2017).
30. Madsen, M. *et al.* Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Lesions Do Not Accelerate Atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. *Am. J. Pathol.* **188**, 1486–1496 (2018).
31. Cheung, M. C. *et al.* Body Surface Area Prediction in Normal, Hypermuscular, and Obese Mice. *J. Surg. Res.* **153**, 326–331 (2009).

32. Pachman, D. R. *et al.* Randomized clinical trial of imiquimod: An adjunct to treating cervical dysplasia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **206**, 42.e1-42.e7 (2012).
33. Adams, S. *et al.* Topical TLR7 agonist imiquimod can induce immune-mediated rejection of skin metastases in patients with breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **18**, 6748–6757 (2012).
34. Gouin, O. *et al.* TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization. *Protein Cell* **8**, 644–661 (2017).
35. Fischer, M. J. M. *et al.* Direct evidence for functional TRPV1/TRPA1 heteromers. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **466**, 2229–2241 (2014).
36. Wei, J. J. *et al.* Activation of TRPA1 nociceptor promotes systemic adult mammalian skin regeneration. **5683**, 1–9 (2020).
37. Kistner, K. *et al.* Systemic desensitization through TRPA1 channels by capsazepine and mustard oil - A novel strategy against inflammation and pain. *Sci. Rep.* **6**, 1–11 (2016).
38. Bertin, S. *et al.* The TRPA1 ion channel is expressed in CD4+ T cells and restrains T-cell-mediated colitis through inhibition of TRPV1. *Gut* gutjnl-2015-310710 (2016). doi:10.1136/gutjnl-2015-310710
39. Kun, J. *et al.* Upregulation of the transient receptor potential ankyrin 1 ion channel in the inflamed human and mouse colon and its protective roles. *PLoS One* **9**, (2014).
40. Kanneganti, T. D. *et al.* Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* **440**, 233–236 (2006).
41. Schön, M. P., Schön, M. & Klotz, K. N. The small antitumoral immune response modifier imiquimod interacts with adenosine receptor signaling in a TLR7- and TLR8-independent fashion. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 1338–1347 (2006).
42. Ostrowski, S. M., Belkadi, A., Loyd, C. M., Diaconu, D. & Ward, N. L. Cutaneous denervation of psoriasiform mouse skin improves acanthosis and inflammation in a sensory neuropeptide-dependent manner. *J. Invest. Dermatol.* **131**, 1530–1538 (2011).

PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

Az értekezés alapját képező eredeti közlemények:

1. **Horváth S**, Komlódi R, Perkecz A, Pintér E, Gyulai R, Kemény Á. Methodological refinement of Aldara-induced psoriasiform dermatitis model in mice. *Sci. Rep.* **9**,3685 (2019). (D1) **IF:3,998**
2. Kemény Á*, Kodji X*, **Horváth S***, Komlódi R, Szőke É, Sándor Z, Perkecz A, Gyömörei C, Sétáló G, Kelemen B, Bíró T, Tóth BI, Brain SD, Pintér E, Gyulai R. TRPA1 acts in a protective manner in imiquimod-induced psoriasiform dermatitis in mice, *J. Invest. Dermatol.* **138**, 1774–1784 (2018). (D1) **IF:6,29**

*: megosztott első szerzős eredeti közlemény

Egyéb eredeti közlemények:

1. **Horváth Szabina**, Gyulai Rolland. A pikkelysömör kísérletes állatmodelljei. *Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle.* 2018;94(4):168-171.
2. Kuczog, A., Galambos, A., **Horváth, Sz.**, Máta, A., Kozma, P., Szegedi, E., Putnok, P. (2012) Mapping of crown gall resistance locus *Rcg1* in grapevine. *Theor Appl Genet* **125**:1565–1574. (Q1) **IF:3,658**

Az értekezés alapját képező eredeti közlemények kumulatív impakt faktora: 10,288

Hivatkozások száma: 33

Független hivatkozások száma: 23

Az összes közlemény kumulatív impakt faktora: 13,946

Konferencia előadások és poszter prezentációk az értekezés témájában:

1. Á. Kemény, **S. Horváth**, R. Komlódi, A. Perkecz, C. Gyömörei, E. Pintér, R. Gyulai: The TRPA1 ion channel mediates inhibitory effects on imiquimod-induced psoriasiform skin inflammation. *Journal of Investigative Dermatology* 136: 9S. p.S228. (2016). 46th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research. München, Németország: 2016.09.07 - 2016.09.10. (poszter)
2. Á. Kemény, **S. Horváth**, R. Komlódi, X. Kodji, Z. Sándor, É. Szőke, A. Perkecz, E. Pintér, R. Gyulai: Opposing effect of TRPA1 and TRPV1 on imiquimod-induced psoriasiform dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology* 137: 10S. Supplement 2, p.S251. (2017). 47th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research. Salzburg, Ausztria: 2017.09.27-30. (poszter)
3. **S. Horváth**, Á. Kemény, R. Komlódi, A. Perkecz, C. Gyömörei, E. Pintér, R. Gyulai: Methodological improvement of imiquimod-induced psoriasiform dermatitis model. *Journal of Investigative Dermatology* 137: 10S. Supplement 2, p.S272. (2017). 47th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research. Salzburg, Ausztria: 2017.09.27-30. (poszter)
4. **Horváth S**, Kemény Á, Komlódi R, Perkecz A, Pintér E, Gyulai R. LB1561 Localized Aldara-induced psoriasiform dermatitis model using Finn chambers. International Investigative Dermatology Conference. Orlando, Florida 2018. 05. 16-19. poszter
5. Kemény A, **Horváth S**, Komlódi R, Kodji X, Sándor Z, Szoke É, Perkecz A, Pinter E, Gyulai R. LB1563 Protective role of TRPA1 on imiquimod-induced psoriasiform dermatitis. International Investigative Dermatology Conference. Orlando, Florida 2018. 05. 16-19. poszter
6. Kemény Ágnes, **Horváth Szabina**, Gyömörei Csaba, Botz Bálint, Bölcskei Kata, Pintér Erika, Gyulai Rolland: A TRPV1 és TRPA1 receptorok szerepe az imiquimoddal kiváltott egér pszoriázis modellben. A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság Experimentális Farmakológiai Szekciójának IX. Szimpoziuma, Velence, Magyarország. 2015.03.26-28. (poszter)
7. **Horváth Szabina**, Kemény Ágnes, Komlódi Rita, Gyömörei Csaba, Bölcskei Kata, Pintér Erika, Gyulai Rolland (2015): TRPA1 szerepének vizsgálata imiquimod-indukálta psoriasiform bőrgyulladásban. II. Idegtudományi Centrum/Szentágotthai János Kutatóközpont PhD és TDK konferencia, Pécs, Magyarország. Előadás absztrakt.
8. Ágnes Kemény, **Szabina Horváth**, Rita Komlódi, Csaba Gyömörei, Kata Bölcskei, Erika Pintér, Rolland Gyulai: Investigation of the role of TRPA1 receptors in imiquimod-induced psoriasiform skin inflammation in mice. 23rd Leuven TRP meeting. Leuven, Belgium: 16-18 Sept 2015. (poszter)
9. Kemény Ágnes, **Horváth Szabina**, Pintér Erika, Gyulai Rolland: Imiquimoddal indukált pszoriázis modell vizsgálata egérben. IV. Harkányi Psoriasis Konferencia 2015.10.16-17. (előadás)
10. **Horváth Szabina**, Kemény Ágnes, Komlódi Rita, Gyömörei Csaba, Bölcskei Kata, Pintér Erika, Gyulai Rolland (2015): TRPA1 szerepének vizsgálata imiquimod-indukálta psoriasiform bőrgyulladásban. Magyar Dermatológiai Társulat 88. Nagygyűlése, Budapest, Magyarország. (előadás)
11. **Horváth Szabina**, Kemény Ágnes, Komlódi Rita, Gyömörei Csaba, Pintér Erika, Gyulai Rolland: A TRP ioncsatornák szerepe a bőr immunfolyamatainak szabályozásában (2016). Magyar Dermatológiai Társulat 89. Nagygyűlése. Budapest, Magyarország. 2016. 11. 24-26. (előadás)
12. Kemény Á., **Horváth Sz.**, Komlódi R., Gyömörei Cs., Bölcskei K., Pintér E., Gyulai R.: A Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1 receptorok szerepe az imiquimoddal kiváltott pszoriázis-szerű egérmodellben. Magyar Farmakológiai, Anatómus, Mikrocirkulációs és Élettani Társaságok

- Közös Tudományos Konferenciája (2016), Pécs, Magyarország. Program összefoglalók P3.114. (poszter)
13. **Szabina Horváth**, Ágnes Kemény, Rita Komlódi, Anikó Perkecz, Csaba Gyömörei, Erika Pintér, Rolland Gyulai: Imiquimod-induced psoriasiform skin inflammation is enhanced in transient receptor potential ankyrin-1 ion channel knockout mice (2016). 3rd Meeting of Middle-European Societies for Immunology and Allergology. Budapest, Magyarország. 2016. 12. 01-03. (poszter)
 14. Kemény Ágnes, **Horváth Szabina**, Komlódi Rita, Gyömörei Csaba, Szőke Éva, Sándor Zoltán, Pintér Erika, Gyulai Rolland: A TRPA1 és TRPV1 ioncsatornák szerepének vizsgálata az imiquimoddal kiváltott pszoriázis-szerű gyulladás modellben. A Magyar Élettani Társaság, a Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság közös Vándorgyűlése, Debrecen, Magyarország. 2017. 06. 13-16. (előadás)
 15. **Horváth Szabina**, Kemény Ágnes, Komlódi Rita, Szőke Éva, Sándor Zoltán, Gyömörei Csaba, Pintér Erika, Gyulai Rolland: TRPA1 receptorok gyulladáscsökkentő hatása Aldara-indukált psoriasiform bőrgyulladásban. Doktoranduszok a klinikai kutatásokban. Pécs, Magyarország. 2017. 10.28. (előadás)
 16. **Horváth Szabina**, Kemény Ágnes, Komlódi Rita, Szőke Éva, Sándor Zoltán, Gyömörei Csaba, Pintér Erika, Gyulai Rolland: A Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1 (TRPA1) receptorok gyulladáscsökkentő hatása Aldara-indukált psoriasiform bőrgyulladásban. Magyar Dermatológiai Társulat 90. Nagygyűlése. Budapest, Magyarország. 2017. 11. 23-25. (előadás)
 17. Kemény Ágnes, **Horváth Szabina**, Komlódi Rita, Perkecz Anikó, Pintér Erika, Gyulai Rolland: Az imiquimoddal kiváltott psoriasiform bőrgyulladás állatkísérletes modelljének továbbfejlesztése. Magyar Dermatológiai Társulat 90. Nagygyűlése. Budapest, Magyarország. 2017. 11. 23-25. (poszter)
 18. Kemény Ágnes, **Horváth Szabina**, Komlódi Rita, Xenia Kodji, Sándor Zoltán, Szőke Éva, Perkecz Anikó, Pintér Erika, Gyulai Rolland: A TRPA1 receptorok gyulladáscsökkentő szerepe imiquimoddal kiváltott pszoriázis-szerű dermatitisben. Magyar Élettani Társaság Vándorgyűlése, Szeged, Magyarország. 2018. június 27-30. (poszter)
 19. **Horváth Szabina**, Komlódi Rita, Perkecz Anikó, Pintér Erika, Gyulai Rolland, Kemény Ágnes: Methodological refinement of Aldara-induced psoriasiform dermatitis model using Finn chambers. Magyar Dermatológiai Társulat 91. Nagygyűlése. Budapest, Magyarország. 2018. 11. 29-12.01. (előadás)
 20. Kemény Ágnes, **Horváth Szabina**, Komlódi Rita, Perkecz Anikó, Pintér Erika, Gyulai Rolland: A TRPV1 és a TRPA1 ioncsatornák szerepének összehasonlítása az imiquimoddal kiváltott psoriasiform bőrgyulladás állatkísérletes modelljében. Magyar Dermatológiai Társulat 91. Nagygyűlése. Budapest, Magyarország. 2018. 11. 29- 12. 01. (poszter)

Egyéb konferencia előadások és poszter prezentációk:

1. Lengyel, Z., Kinyo, A., **Horvath, S.**, Nagy, A., Gyulai, R.: Expression patterns of clock and clock controlled gene mRNAs in psoriatic skin lesions. *Journal of Investigative Dermatology* 135: p. S68. (2015). 45th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research. Rotterdam, Hollandia: 2015.09.09 -2015.09.12. (poszter)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőimnek, Gyulai Rolland Professor Úrnak és Dr. Kemény Ágnesnek PhD munkám szakmai irányítását. Lelkesedésük, pozitív gondolkodásuk, valamint a szakma iránti elkötelezettségük követendő példaként szolgált számomra.

Külön köszönöm Gyulai Rolland Professor Úrnak az öt évvel ezelőtt megadott bizalmat, aminek köszönhetően a Bőrklinikán kezdettem meg PhD tanulmányaimat.

Rengeteget köszönhetek Dr. Kemény Ágnesnek, aki a kísérletes munka rejtelseibe vezetett be. Köszönöm a sok tanítást, a mindig jó hangulatú közös munkát, hogy bármikor fordulhattam hozzá, hogy mindig számíthattam a segítségére.

Köszönöm Pintér Erika Professor Asszonynak, hogy a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetben helyet és lehetőséget biztosított a kutatási munka kivitelezéséhez, valamint szakmai tanácsait, iránymutatását, amely mindig előre vitte a kutatást.

Szeretném megköszönni Reiszné Horváth Mária, Marcsi megbízható asszisztensi munkáját, segítőkészségét, szakmai tapasztalatát és vidámságát. Örömmre szolgál, hogy együtt dolgozhattunk.

Köszönettel tartozom Dr. Szőke Évának és Dr. Sándor Zoltánnak az *in vitro* kísérletek kivitelezésében és az eredmények kiértékelésében nyújtott segítségért. Köszönöm Dr. Gyömörei Csabának a szövettani metszetek kiértékelésében nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom Komlódi Ritának, aki TDK hallgatóként aktívan részt vett az *in vivo* és *in vitro* kísérletekben. Köszönöm Perkecz Anikónak a szövettani és immunfestési munkákban nyújtott segítséget, valamint Önböli Gyuláné Dórának, Draskóczi Lillának, Disztl Cecíliának, Gazda Kingának és Szarka Zsanettnek a kísérletek során nyújtott nélkülözhetetlen segítségét.

Szeretném megköszönni közvetlen Kollégáimnak, hogy hasznos tanácsaikkal, biztatásukkal mindig segítették a munkámat.

Emellett köszönöm a Bőr-, Nemikórtani és Onkodermatológiai Klinika, valamint a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet minden dolgozójának segítségét, akik támogattak doktori munkám során.

Végül, de nem utolsósorban hálásan köszönöm családom és barátaim türelmét, támogatását, biztatását, mely lehetővé tette, hogy ez a munka létrejöhessen.

A munka a következő pályázatok támogatásával valósult meg: GINOP-2.3.2-15-2016-00050 „A peptiderg szignalizáció komplexitása és szerepe szisztémás betegségekben”, PTE ÁOK-KA-2015/11, 20765-3/2018/FEKUTSTRAT „Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program - Biomarkerek azonosítása a hormonális- és az immunrendszer nyomon követésére: diagnosztikai eljárások fejlesztése biotechnológiai módszerekkel”, NKFIH Kutatói kezdeményezésű témapályázat: K_18_128210.