

# A KAPSZAICIN-ÉRZÉKENY SZENZOROS IDEGVÉGZŐDÉSEK ÉS A TRPV1 RECEPTOR SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA SZKLERODERMA ÉS KRÓNIKUS ARTRITISZ ÁLLATMODELLEKBEN

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS



**Szabó Árpád**

Gyógyszertudományok Doktori Iskola  
Neurofarmakológia Program  
Programvezető: Dr. Pintér Erika, Dr. Szolcsányi János  
Témavezető: Dr. Helyes Zsuzsanna, Dr. Pintér Erika

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR  
FARMAKOLÓGIAI ÉS FARMAKOTERÁPIAI INTÉZET

2011.

## BEVEZETÉS, A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI

A klasszikus idegszabályozási elmélet szerint az érzőidegek a szenzoros stimulusokat és a fájdalmat közvetítik a test különféle részeiről (ízületek, bőr, belső szervek) a központi idegrendszer felé. A perifériás idegrendszer másik csoportja a befutó ingerekkel kiváltott reflexek útján efferens, azaz mozgató vagy vegetatív működéseket lát el. A **kapszaicin-érzékeny** érzőidegek az idegszabályozás elvi szempontjából különleges és érdekes harmadik csoportot képviselnek, ezek perifériás végződése nemcsak a klasszikus afferens működéssel rendelkeznek (nocicepció), hanem egyben efferens funkciót is ellátnak. Közvetlenül, reflex nélkül, olyan neuropeptid szabadul fel belőlük, amelyek erőteljes értágulatot, plazmafehérje-kiáramlást és gyulladáshoz vezető sejtaktivációt okoznak a beidegzési területen, ezt a jelenséget összefoglalva *neurogén gyulladásnak* nevezzük. Ezek a gyulladáskeltő mediátorok a kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP), amely elsősorban vazodilatációt okoz, valamint a tachykininek, pl. a SP és a neurokinin A (NKA), melyek a plazmaprotein-extravazációért felelősek. Ezek a folyamatok közvetítik a kapszaicin-érzékeny afferensek **lokális efferens funkcióit**. A későbbi kutatások derítették fényt arra, hogy ugyanezen aktivált szenzoros idegvégződésekben az előzőekben felsorolt gyulladáskeltő neuropeptideken kívül szomatosztatin (SOM) is felszabadul, amely a keringésbe jutva szisztémás gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatásokkal rendelkezik. Ez az érzőideg-végződések harmadik, **szisztémás efferens funkciója**, amelyet a szomatosztatin endokrin és parakrin hatásainak mintájára Szolcsányi professzor *szenzokrin hatásnak* nevezett el.

A kapszaicin, a paprika (*Capsicum annuum* és *Capsicum frutescens*) csípős anyaga, kémiai szerkezetét tekintve alkaloid, 8-metil-N-vanillil-transz-6-nonénamid. A kapszaicin a hatásait receptorális úton fejti ki. A kapszaicin receptort expresszálo gént 1997-ben azonosították és a kapszaicin receptorát elnevezték Vanilloid 1 receptornak (VR1). Később a receptorok szerkezetén alapuló nemzetközi nomenklatura szerint ezt a nevet megváltoztatták, a ligandfüggő kationcsatornát a Tranzien Receptor Potenciál (TRP) nagycsaládba sorolták és a vanilloid család 1-es számú tagjaként Tranzien Receptor Potenciál Vanilloid 1-nek (TRPV1) nevezték.

A TRPV1 polimodális szenzor funkciójú kationcsatorna, amely számos fizikai vagy kémiai ingerrel pl. fájdalmas, 43°C feletti hőmérséklettel és pH 6 alatti proton-koncentrációval aktiválható az intra- és extracelluláris oldalról is. A receptor aktiválódásakor a sejtbe Na<sup>+</sup>- és Ca<sup>2+</sup>-ionok áramlanak be, melyet K<sup>+</sup>-ionoknak a sejtből való kiáramlása követ. A Na<sup>+</sup>-ionok

beáramlása elsősorban az akciós potenciál kialakulásáért felelős, melynek következményeképpen kialakul a nocicepció, fájdalomérzet. A  $\text{Ca}^{2+}$ -influx a szenzoros neuropeptidek idegvégződésekből történő felszabadulásához vezet. Tartós vagy ismételt aktiváció hatására a sejtben felhalmozódó magas kation koncentráció a citoplazma és a mitokondriumok duzzadását okozza, ennek hosszú távú következményeként a sejtek energiaforgalma csökken, az idegvégződés működésképtelenné válik. Ez a folyamat adja a molekuláris hátterét a nagy dózisu kapszaicinnal történő előkezelés hatására kialakuló deszenzibilizációnak. A TRPV1 receptor funkcióinak vizsgálatában új lehetőség nyílt, amikor 2000-ben két kutatócsoport egymástól függetlenül TRPV1 receptor génhianyos egereket állított elő. Ezek segítségével a TRPV1 ioncsatorna működése és jelentősége szelektíven vizsgálható *in vivo* modellekben.

A TRPV1 receptor aktiválódása során felszabaduló szisztémás gyulladás gátló szomatosztatin ígéretes gyulladásgátló és fájdalomcsillapító szer lehetne, azonban a natív szomatosztatin terápiás alkalmazását rendkívül széles hatásspektruma és nagyon rövid (3 percnél kevesebb) plazma eliminációs félléletideje akadályozza. Stabil, szelektív  $\text{sst}_4/\text{sst}_1$  agonisták azonban új terápiás lehetőséget nyújthatnak a gyulladáscsökkentésben és a fájdalomcsillapításban. E vegyületek nagy előnye, hogy nem rendelkeznek a szomatosztatin  $\text{sst}_2$ ,  $\text{sst}_3$  és  $\text{sst}_5$  receptorai által közvetített endokrin hatásokkal. Az MTA Peptidbiokémiai Kutatócsoportja által szintetizált stabil ciklikus heptapeptid, a TT-232 (D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>), ígéretes gyógyszerjelöltnek tűnik.

## CÉLKITŰZÉSEK

A bőr és az ízület különösen gazdagon innervált kapszaicin-érzékeny szenzoros rostokkal, amelyek fontos modulátor funkciókkal rendelkeznek neurogén gyulladáshoz és fájdalommal járó folyamatokban. Kísérleteinkben ezért a peptiderg érzőideg-végződések, a rajtuk lokalizálódó TRPV1 ioncsatorna és a belőlük felszabaduló szenzoros neuropeptidok szerepének komplex vizsgálatát végeztük szkleroderma és ízületi gyulladás *in vivo* modelljeiben funkcionális, biokémiai, immunológiai és morfológiai módszerekkel.

1. Munkám első szakaszában a TRPV1 receptor jelentőségét és az aktivációjával felszabaduló vazóaktív szenzoros neuropeptid, a CGRP, szerepét vizsgáltuk bleomycinnel kiváltott fibrotikus és gyulladáshoz vezető bőrelváltozás patomechanizmusában, TRPV1 receptor és CGRP génhányos egértörzsek felhasználásával.

2. a) A kísérletek második része a kapszaicin-érzékeny afferensek és a szenzoros eredetű szomatosztatin krónikus artritiszben és következményes hiperalgéziában betöltött szerepének felderítésére irányult a reumatoid artritisz patkánymodelljében.

b) Ezen túlmenően a szintetikus heptapeptid sst<sub>4</sub> receptor agonista, a TT-232, hatásait is vizsgáltuk e modellben.

c) Célunk volt továbbá, az érzőrostokon lokalizálódó TRPV1 receptor szerepének és aktivációs/szenzitivizációs mechanizmusainak vizsgálata krónikus ízületi gyulladásban génhányos egereken enzimgátlók segítségével.

## I. FEJEZET

### A TRPV1 RECEPTOR ÉS A CGRP SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA BLEOMYCIN-INDUKÁLTA SZKLERODERMA EGÉRMODELLBEN RECEPTOR GÉNHIÁNYOS EGEREK FELHASZNÁLÁSÁVAL

#### 1. Kísérleteink irodalmi háttere:

A szkleroderma ismeretlen eredetű autoimmun betegség, leggyakrabban a 40-es életévben jelentkezik és nőkben tízszer gyakoribb. A kórképre jellemző elváltozások érinthetik csak a bőrt és a szubkután szöveteket, ilyenkor lokális szklerodermáról beszélünk, illetve érinthet különböző belső szerveket is, ekkor az elváltozást szisztémásnak nevezik, ennek megkülönböztetik diffúz és limitált formáját. Létrejöttében bizonyított a fibroblasztok fokozott kollagén bioszintézise, de az nem ismert, hogy mi indítja őket arra, hogy a szöveteket kollagénnel „megfojtsák”. Etiológiáját tekintve két fő hipotézis ismert. Az immunológiai hipotézis szerint a fibrózis az immunrendszer abnormális aktiválódására bekövetkező szekunder elváltozás. Feltételezik, hogy ismeretlen antigénre reagáló T-sejtek gyűlnek fel a bőrben és az általuk termelt citokinek hatásain keresztül eredményezik a fibrotikus elváltozásokat. A vaszkuláris hipotézis szerint a mikrovaszkulaturát visszatérő endotél károsodás éri primer etiológiai tényezőként. A betegség által érintett területek a bőr, a muszkuloszkeletális rendszer, a gasztrointesztinális traktus, a tüdők, a vesék, valamint a szív. Jelenleg nincs olyan szer, mely meggyógyítaná a szklerodermát, a kezelés elsősorban tüneti.

A szkleroderma más szisztémás autoimmun betegséghez hasonlóan leggyakrabban Raynaud-jelenséggel kezdődik, ami az akrális területek szimmetrikus elfehéredését, cianózisát jelenti hideg vagy érzelmi stressz hatására. Ismert, hogy a Raynaud-jelenséget mutató, és szklerodermás betegek bőrmintáiban a CGRP immunoreaktív neuronok száma jelentősen lecsökken az egészséges kontroll páciensekhez viszonyítva.

A szkleroderma kísérletes vizsgálatához számos állatmodellt kifejlesztettek, de mindezidáig nem ismert olyan modell, amely a klinikai szkleroderma minden elváltozását magában hordozza. Kísérleteinkhez a Yamamoto által kifejlesztett bleomycin-indukálta lokális szkleroderma modellt használtuk, melyben a szkleroderma jellegű elváltozások a folyamatos helyi bleomycin kezelés következtében alakulnak ki. A bleomycin egy daganatellenes antibiotikum, melyet a *Str. verticillus* termel. A különböző lokalizációjú laphám rákokra igen jól hat. Főleg hererák, fej-

nyak daganatok, tüdőrák és nyelőcsőrák kezelésére használják, jól ismert mellékhatása a tüdőfibrózis.

## 2. Anyagok és módszerek:

Az egerek hátbőre alá 30 napon keresztül 0,1 ml 100 µg/ml koncentrációjú bleomycint injektáltunk, a kontroll csoportban ugyanilyen térfogatban, szintén a hátbőr alá a bleomycin oldószerét, foszfát puffert (PBS) adtuk be. Az állatokat négy-négy csoportba osztottuk. A TRPV1 receptor szerepének vizsgálat során bleomycin-kezelt TRPV1<sup>+/+</sup> (vad), bleomycin-kezelt TRPV1<sup>-/-</sup> (KO) valamint PBS kezelt TRPV1<sup>+/+</sup> (vad) és PBS kezelt TRPV1<sup>-/-</sup> (KO) csoportokat alkottunk, az egyedszám 10-12 állat volt minden egyes csoportban. A CGRP receptor szerepének tisztázására irányuló kísérletekben bleomycin-kezelt CGRP<sup>+/+</sup> (vad), bleomycin kezelt CGRP<sup>-/-</sup> (KO) valamint PBS kezelt CGRP<sup>+/+</sup> (vad) és PBS kezelt CGRP<sup>-/-</sup> (KO) csoportokat alkottunk, az egyedszám 8-10 állat volt minden egyes csoportban.

Az utolsó napi bleomycin injekció beadását követő napon az egereket elaltattuk, majd 6 mm átmérőjű bőrdarabot távolítottunk el a tarkótáji területről, a mintákat az alábbi vizsgálatoknak vetettük alá:

### Szöveti vizsgálatok:

A mintákat paraffinos beágyazást követően hematoxilin-eozinnal és a kollagént erős pirosan megjelenítő pikrinsziriuszal festettük meg. A kialakult szklerózis mértékét szemikvantitatív szövettani pontozással határoztuk meg. Mindegyik mintán 0-4-ig pontoztuk a bőr vastagságát, a gyulladás intenzitását, a kollagén kötegek rendezettségét és mennyiségét, így az összpontszám 0 és 12 közötti értéket vehetett fel.

### Bőrvastagság mérése:

A kimetszett bőr vastagságát 40-szeres nagyításon határoztuk meg, a dermo-epidermális junction és a dermo-szubkután junction közötti távolságot µm-ben kifejezve.

### Myofibroblasztok számának meghatározása:

A szklerodermás bőrben felszaporodó myofibroblasztok számának a meghatározása a myofibroblasztokra jellemző α-smooth muscle actin (α-SMA) immunhisztokémiai festésével történt.

A hidroxiprolin-tartalom meghatározása biokémiai vizsgálattal:

A hidroxiprolin szinte kizárólag a kötőszöveti kollagénben és az elasztinban található, emiatt széles körben használják a kollagén jelenlétének, és mennyiségének kimutatására. A minták hidroxiprolin tartalmát spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg, egy előzőleg felvett standard görbe segítségével, és az így kapott értéket  $\mu\text{g}$  hidroxiprolin-tartalomban kifejezve ábrázoltuk.

Az I-típusú kollagén  $\alpha 1$ -lánc mRNS szintjének vizsgálata kvantitatív RT-PCR módszerrel:

A minta teljes RNS tartalmát izoláltuk, a vizsgált specifikus mRNS szinteket LightCycler kvantitatív PCR szisztéma segítségével amplifikáltuk és határoztuk meg.

Statisztikai módszerek:

A kapott eredményeket átlag  $\pm$  SEM formában fejeztük ki az adott csoportokra vonatkoztatva. A vizsgálati módszerek kiértékeléséhez a nem parametrikus Mann Whitney U-próbát alkalmaztunk. A 0,05 alatti p-értéket tekintettük szignifikáns különbségnek a vizsgált csoportok között.

### 3. Eredmények:

3.1. A bleomycin-indukálta modell vizsgálata TRPV1<sup>+/+</sup> (vad típusú) egérben:

Az összesített szklerózis pontszám 58%-al volt magasabb ( $6.33 \pm 0.19$  ill.  $4.00 \pm 0.31$ ), a bőrvastagság 42%-al növekedett meg ( $393.05 \pm 15.41 \mu\text{m}$  ill.  $278.62 \pm 11.38 \mu\text{m}$ ) és az  $\alpha$ -SMA-pozitív sejtek száma 75%-al volt magasabb ( $16.33 \pm 3.31$  ill.  $9.3 \pm 1.34$  látómezőként) a bleomycin-kezelt TRPV1<sup>+/+</sup> csoportban a PBS-kezelt TRPV1<sup>+/+</sup> csoporthoz képest. A szövettani elváltozásokhoz hasonlóan a minták spektrofotometriásan meghatározott kollagén specifikus aminosav a hidroxiprolin tartalma is szignifikánsan 47.5 %-al magasabb volt ( $118.5 \pm 6.7$  ill.  $80.3 \pm 10.2 \mu\text{g/bőrminta}$ ) a bleomycin-kezelt csoportban a PBS-kezelt egércsoporthoz képest.

A PBS kezelés önmagában nem okozott szignifikáns szövettani elváltozásokat a kezeletlen TRPV1<sup>+/+</sup> egerek bőrmintáihoz képest. Nem volt kimutatható különbség a kezeletlen TRPV1<sup>+/+</sup> és TRPV1<sup>-/-</sup> egerek bőrének szövettani struktúrája között.

### 3.2. A TRPV1 receptor szerepének vizsgálata bőrszklerózisban:

A bleomycin kezelés hatására a TRPV1<sup>-/-</sup> (KO) állatok szövettani elváltozásai kifejezettebbek voltak, az összetett szklerózis pontszám szignifikánsan magasabb volt (7.46±0.20 ill. 6.33±0.19) a bleomycin-kezelt TRPV1<sup>+/+</sup> (vad) csoporthoz képest. A bőr vastagság értéke is szignifikánsan nagyobb volt (464.86±10.15 µm ill. 393.05±15.41 µm) és az α-SMA-pozitív sejtek száma is jelentősen emelkedett (24.03±3.07 ill. 16.33±3.31 látómezőként) a bleomycin-kezelt TRPV1<sup>-/-</sup> csoportban a szintén bleomycin-kezelt TRPV1<sup>+/+</sup> csoporthoz képest. A szövettani elváltozásokkal összhangban a minták hidroxiprolin tartalma is szignifikánsan 57 %-al magasabb volt (186.605±8.4 ill. 118.5±6.7 µg/bőrminta) a bleomycin-kezelt TRPV1<sup>-/-</sup> csoportban a TRPV1<sup>+/+</sup> csoporthoz viszonyítva. A PBS kezelt TRPV1<sup>-/-</sup> illetve a PBS kezelt TRPV1<sup>+/+</sup> minták között nem volt szignifikáns különbség sem különböző szövettani módszerekkel sem a hidroxiprolin tartalom biokémiai meghatározásával.

### 3.3. A szklerotikus bőr I-es típusú kollagén α1 lánc mRNS expressziójának vizsgálata:

A különböző csoportoknak a vad PBS kezelt csoporthoz viszonyított I-es típusú kollagén α1 lánc mRNS szint értékeit megvizsgálva nem figyelhető meg szignifikáns különbség a csoportok mRNS expressziója között. Az I-es típusú kollagén α1 lánc mRNS szintjeiben a teljes 4 hetes kezelés végén nem találtunk jelentős különbséget, ezért megvizsgáltuk a kezelés egy korábbi szakaszában (2 hét után) előlt állatokban is az I-es típusú kollagén mRNS szint mértékét, de itt sem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a bleomycin kezelés hatására. A kapott eredmények alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a bleomycin kezelés nem befolyásolja az I-es típusú kollagén α1 lánc mRNS expresszióját.

### 3.4. A CGRP receptor szerepének vizsgálata a szkleroderma-modellben:

A szövettani vizsgálatok a bleomycin-kezelt CGRP<sup>+/+</sup> csoportban 42%-al magasabb összetett szklerózis pontszámot (4.25±0.38 ill. 2.98±0.51), 52%-al magasabb bőrvastagság értéket (434.49±16.41 µm ill. 285.85±17.36 µm) és 62%-al több α-SMA-pozitív sejtet (15.83±3.6 ill. 9.75±0.88 látómezőként) mutattak ki a megfelelő PBS kezelt csoporthoz viszonyítva. A hidroxiprolin mennyisége is 47%-al megnőtt (137.6±14.58 ill. 93.4±10.65 µg/bőrminta) a bleomycin kezelés eredményeképp a kontroll CGRP<sup>+/+</sup> PBS kezeléshez képest.

A CGRP receptor hiánya fokozott szklerotikus elváltozásokat eredményezett bleomycin kezelés hatására, az összetett szklerózis pontszám szignifikáns mértékben emelkedett (6.21±0.58 ill. 4.25±0.47) a bleomycin kezelt CGRP<sup>-/-</sup> (KO) csoportban a bleomycin-kezelt CGRP<sup>+/+</sup> (vad) csoporthoz képest. A bőrvastagság értéke 29%-os emelkedést mutatott



( $557.23 \pm 18.38 \mu\text{m}$  ill.  $434.49 \pm 16.41 \mu\text{m}$ ) a bleomycin-kezelt CGRP<sup>-/-</sup> csoportban a hasonlóan kezelt CGRP<sup>+/+</sup> csoporthoz viszonyítva. Az  $\alpha$ -SMA-pozitív sejtek száma is szignifikánsan emelkedett ( $27.83 \pm 4.58$  ill.  $15.83 \pm 3.60$  látómezőként) a bleomycin-kezelt CGRP<sup>-/-</sup> csoportban a szintén bleomycin-kezelt CGRP<sup>+/+</sup> csoporthoz képest. A szövettani elváltozásokkal jól egyezően a minták hidroxiprolin tartalma is szignifikánsan magasabb volt ( $179.30 \pm 18.90$  ill.  $137.60 \pm 14.58 \mu\text{g/bőrminta}$ ) a bleomycin-kezelt CGRP<sup>-/-</sup> csoportban a CGRP<sup>+/+</sup> csoporthoz viszonyítva. Meglepő módon a PBS kezelt CGRP<sup>-/-</sup> állatok bőrmintáin is fokozott szklerotikus elváltozások voltak észlelhetők, mint emelkedett összetett szklerózis pontszám ( $3.96 \pm 0.49$  ill.  $2.98 \pm 0.51$ ) nagyobb bőrvastagság érték ( $386.25 \pm 10.26 \mu\text{m}$  ill.  $285.85 \pm 17.36 \mu\text{m}$ ), emelkedett  $\alpha$ -SMA-pozitív sejt szám ( $15.04 \pm 2.39$  ill.  $9.75 \pm 0.88$  látómezőként) és megnövekedett hidroxiprolin tartalom ( $126.56 \pm 13.10$  ill.  $93.4 \pm 10.65 \mu\text{g/bőrminta}$ ) volt megfigyelhető a PBS kezelt CGRP<sup>+/+</sup> csoporthoz képest. A PBS kezelés hatására a CGRP<sup>-/-</sup> csoportban kialakult szklerotikus elváltozások hasonló mértékűek voltak a bleomycin-kezelt CGRP<sup>+/+</sup> csoportban kialakult elváltozásokhoz, ezért megvizsgáltuk a nem kezelt CGRP knockout és vad egerek bőrmintáit is, és azt tapasztaltuk, hogy sem a szövettani szerkezetben sem a hidroxiprolin tartalomban nincs szignifikáns különbség a kezeletlen állatok között.

#### 4. Megbeszélés, következtetések:

Az általunk értékelt kísérletsorozatban a TRPV1 receptor és a CGRP szerepére fókuszáltunk krónikus fibrotikus-szkerotikus körülmények közt. Az általunk használt C57BL/6 törzsből létrehozott TRPV1<sup>+/+</sup> egerekben a 30 napos bleomycin kezelés körülbelül 150%-os bőrmegvastagodást, jelentős szövettanilag értékelhető bőrszkerózist, 75%-al megnövekedett számú  $\alpha$ -SMA-pozitív sejtet és 148,5%-al megemelkedett mennyiségű hidroxiprolint eredményezett a kontroll csoportul szolgáló PBS kezelt TRPV1<sup>+/+</sup> csoporthoz képest, mely eredmények összhangban vannak a korábbi C57BL/6 törzsrre vonatkozó irodalmi eredményekkel. A korábbi adatokkal szemben a bleomycin kezelés hatására az I-típusú kollagén  $\alpha 1$ -lánc mRNS szintjének emelkedését nem tudtuk kimutatni kvantitatív PCR módszerrel. Ezen megfigyelés háttérében nem pontosan tisztázott mi állhat, de az emelkedett kollagén fehérje mennyiség normális mRNS szint mellett több okra is visszavezethető lehet, például a kollagén lebomlási folyamatainak a csökkenésére, fokozott mértékű transzlációra, fokozott mértékű kollagén érési folyamatokra.

A TRPV1 receptor hiánya az általunk vizsgált bleomycin indukálta szkleroderma modellben egyértelműen súlyosbította szklerotikus bőrelváltozásokat szövettani és biokémiai

vizsgálattal egyaránt, A bleomycin-kezelt TRPV1<sup>-/-</sup> (KO) állatokban szignifikáns mértékben magasabb összetett szklerotikus pontszámot, nagyobb bőrvastagság értéket, emelkedett számú  $\alpha$ -SMA-pozitív sejtet és magasabb hidroxiprolin mennyiséget mértünk a szintén bleomycin kezelt TRPV1<sup>+/+</sup> (vad) állatokhoz képest. A kezeletlen knockout és vad állatok bőrének szerkezete között nincs detektálható különbség, vagyis a TRPV1 receptor hiánya önmagában nem okoz fibrotikus-szklerotikus elváltozásokat. A szklerotikus elváltozások kialakulásához profibrotikus tényezők hatásaira van szükség, mint például a bleomycinre. Eredményeink alapján azonban kijelenthető, hogy a TRPV1 receptor jelenléte protektív hatást fejt ki profibrotikus ágensek által kiváltott szklerotikus elváltozásokkal szemben. Feltehetőleg a bleomycin által kiváltott gyulladási folyamatokban keletkező gyulladási mediátorok aktiválják és szenzibilizálják a TRPV1 receptort ami szenzoros neuropeptid felszabadulását eredményezi, melyek eredően védő hatást fejtenek ki a kóros elváltozásokkal szemben az általunk vizsgált modellben.

A TRPV1 receptor aktiválódása során felszabaduló szenzoros neuropeptidek közül az irodalomban kizárólag a CGRP-re található adat, mint egy potenciális protektív faktor a szkleroderma valamint a Raynaud's fenomén patomechanizmusában. Ezen morfológiai megfigyelések alapján CGRP génhányos egereket használtunk a CGRP szklerotikus folyamatokban játszott szerepének tisztázására az általunk használt in vivo bleomycin indukálta szkleroderma modellben. A C57BL/6 törzsből létrehozott CGRP<sup>+/+</sup> csoportban a bleomycin kezelés jól vizsgálható jelentős mértékű morfológiai, biokémiai, szövettani és immunhisztokémiai ( $\alpha$ -SMA) elváltozást okoz. CGRP hiányában a bleomycin kezelés egyértelműen fokozott szklerotikus eredményezett, mind a bőrvastagság, szövettani összpontszám, hidroxiprolin és  $\alpha$ -SMA vonatkozásában. A vizsgálataink az első in vivo bizonyítékot szolgáltatották a CGRP hiányában kialakuló szklerotikus elváltozásokra. Ennek hátterében feltehetőleg a CGRP vasodilatatív hatásának a kiesésének eredményeképp létrejött vazospazmus és következményes ischémia állhat.

Kísérleteink eredményeképp kijelenthetjük, hogy a TRPV1 receptor és a CGRP jelenléte egyértelmű protektív szerepet tölt be a szkleroderma patomechanizmusában. CGRP receptor agonisták pedig terápiás lehetőséget jelenthetnek a szkleroderma kezelésében a jövőben, de természetesen a lehetséges mellékhatásokkal is számolni kell.

## II. FEJEZET

### A KAPSAICIN-ÉRZÉKENY IDEGVÉGZŐDÉSEK ÉS A TRPV1 RECEPTOR SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA ADJUVÁNS-INDUKÁLTA KRÓNIKUS ÍZÜLETI GYULLADÁS MODELLJÉBEN

#### 1. Kísérleteink irodalmi háttere:

A reumatoid arthritisz elsősorban a fiatal, középkorú nőket érinti, hazánkban mintegy 70-80 ezer pácienssel számolhatunk. Ez a kórkép egy autoimmun hátterű, krónikus, progresszív sokízületi gyulladás, mely az ízületek destrukciója és deformitása révén a betegek fájdalmát, mozgáskorlátozottságát, rokkantságát és életminőségük jelentős romlását idézi elő. Az ízületi tok és a szinovium gazdagon innervált kapszaicin-érzékeny szenzoros rostokkal. Ezen idegvégződéses a feszülést és a fájdalmat közvetítik, valamint számos irodalmi adat igazolja, hogy az általuk közvetített neurogén gyulladás jelentős szerepet játszik a krónikus ízületi gyulladásos megbetegedések kialakulásában. Arthritisben szenvedő betegektől származó szinoviális folyadékban a gyulladáskeltő szenzoros neuropeptidok emelkedett szintjét mutatták ki. Arra is van azonban irodalmi adat, hogy más, ugyancsak az aktivált szenzoros idegvégződésekből felszabaduló neuropeptidok (opioid peptidok, galanin, szomatosztatin) kísérleti körülmények között gátolják a krónikus ízületi gyulladás kialakulását. Ízületi gyulladás vonatkozásában tehát a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződésekből felszabaduló mind gyulladáskeltő, mind gyulladásgátló hatású neuropeptidok patofiziológiai jelentőségére is vannak irodalmi adatok.

A krónikus ízületi gyulladásos betegségek jelenlegi terápiája elsősorban a tünetek enyhítésére szolgál. Így kezdetben nem-szteroid típusú gyulladáscsökkentők/fájdalomcsillapítók javasolhatók, míg előrehaladottabb betegségben szteroidok, később az immunszuppresszív hatású bázisterápiás gyógyszerek (methotrexát, leflunomid) adandók. E betegségcsoport oki kezelése tehát korántsem megoldott, és egyetlen olyan gyógyszer sincs forgalomban, amely hatékonyan tudná gátolni a gyulladásos folyamat neurogén komponensét.

#### 2. Anyagok és módszerek:

A krónikus ízületi gyulladást komplett Freund adjuvánszal (CFA, elölt Mycobacterium paraffinolajos szuszpenziója, 1 mg/ml) váltottuk ki (patkányban 100 µl, egérben 50 µl s.c. a

bal talpba és a faroktőbe). A CFA hatására az injekció oldalán sokkal kifejezettebb, de az ellenoldalon is megfigyelhető gyulladáshoz vezető reakció alakul ki a tibiotarzáris ízületekben, amelyet szisztémás gyulladáshoz vezető tünetek (testhőmérséklet-emelkedés, étvágytalanság, testsúlycsökkenés, bágyadtság) kísérnek.

#### A. Patkánykísérletek:

A kísérleteinkben 4 állatcsoportot képeztünk, mind a négy állatcsoportban a fent leírt módon váltottuk ki az ízületi gyulladást.

A kapszaicin-érzékeny afferens szenzoros rostok szerepének vizsgálata céljából a patkányok egy csoportját a TRPV1 agonista RTX-szel kezeltük elő, amely ezen érzőideg-végződések hosszantartó károsodását okozza. Az előkezelés során 3 egymást követő napon 30, 70 és 100 µg/kg RTX-et adtunk az állatoknak s.c. a nyakbőr alá. Az ízületi gyulladást 7 nappal később váltottuk ki. Az RTX deszenzibilizáció sikerességének ellenőrzésére a kísérlet megkezdése előtt elvégeztük kapszaicin szembe cseppentésével (50 µl 0.1%-os kapszaicint) a wipung (szemtörlési) tesztet, az elhárító reakció minden általunk előkezelt állatban hiányzott.

A patkányok másik csoportjának a kapszaicin-érzékeny idegvégződés aktivációjával felszabaduló szomatosztatin szerepének vizsgálatára az sst receptor antagonisták ciklo-szomatosztatinnal (C-SOM) kezeltük az állatokat naponta 21 napon keresztül (20 µg/kg i.p.).

A következő kísérletsorozatban a patkányokat a szintetikus heptapeptid sst<sub>4</sub>/sst<sub>1</sub> agonista TT-232-vel kezeltük a teljes kísérlet alatt (2x50-400 µg/kg/nap i.p.), a kontroll csoportban oldószert alkalmaztunk.

#### B. Egérkísérletek:

A krónikus ízületi gyulladáshoz vezető körülmények között a TRPV1 receptor lehetséges aktiválódásának vizsgálatára mind a TRPV1 receptor génhiányos mind a vad-típusú állatok egy-egy csoportját (n=8-12/csoport) az adjuváns kezelés napjától fogva minden nap a teljes kísérleti periódus alatt az alábbi anyagok valamelyikével kezeltük. A vizsgált vegyületeket azért választottuk, hogy a TRPV1 receptor aktivációjában szerepet játszó lehetséges mediátorokat azonosítsuk.

A lipoxigenáz enzim termékek TRPV1 aktiválásában betöltött szerepének vizsgálatára egy állatcsoportot nor-dihidro-guarénsavval (nor-dihydro-guaretic acid, NDGA), egy nem-szelektív lipoxigenáz-inhibitorral kezeltünk 25 mg/kg/nap dózisban intraperitoneálisan (ip.). A második állatcsoportot a bradykinin lehetséges szenzitivizáló hatásának kimutatására

bradykinin B1 receptor antagonist desArgHOE-140-nel, a harmadikat pedig a bradykinin B2 receptorát blokkoló HOE-140-nel kezeltük (mindkettő esetben 250 µg/kg/nap ip.). A negyedik csoport egerei indometacint (1 mg/kg ip.), egy nem-szelektív ciklooxygenáz enzim gátlót kaptak a ciklooxygenáz enzim termékek lehetséges TRPV1 receptor aktiváló és szenzitivizáló hatásának vizsgálatára. Az egyes kezelt csoportok kontrolljául naponta fiziológiás sóval i.p. kezelt csoport szolgált.

Vizsgálati módszerek:

A lábtérfogat mérése:

A lábak térfogatát Ugo Basile 7140 pletizmométerrel mértük, amely a közlekedőedények elve alapján működő készülék. A térfogatot cm<sup>3</sup>-ben olvastuk le a digitális kijelzőről, a kísérlet 2.,5.,8.,12.,15.,18., 21-adik napján, a mérési adatokat a kezdeti értékekhez viszonyítottuk és az ödémát százalékban fejeztük ki.

A talp érintési érzékenységének mérése:

A talp mechanoczeptív küszöbének meghatározását Ugo Basile dinamikus plantáris eszteziométerrel végeztük, amely a klasszikus von Frey módszer digitalizált változata. A vizsgálat alatt az állatok az állatok talpának középső régióját egy rozsdamentes acélból készült tompa tűskével alulról ingereltük előzetesen beállított dinamikai paraméterekkel. A készülék digitális kijelzőjén grammban leolvasható az a küszöbérték, amelynél az állat felemeli a lábát. Minden eredményt 3 egymás utáni mérés átlagából számoltunk, a mechanikai küszöb változását a saját kezdeti értékhez viszonyított százalékban fejeztük ki.

Szövetteni metszetek készítése és értékelése:

Az altatásban cervikális diszlokációval leölt állatok tibiotarzális ízületét kimetszettük, formalinban fixáltuk, majd dekalcináltuk. Amikor az ízületek megfelelően felpuhultak, Végül a mintákat paraffinba ágyasztuk, majd mikrotómmal 5-7 µm-es szeletekre vágtuk és hematoxilin-eozin eljárással megfestettük.

A gyulladással elváltozásokat egy kísérleteinktől független tapasztalt patológus kolléga értékelte. A szemikvantitatív pontozás a *szinoviális kötőszövet megvastagodása*, *leukocitás infiltrációjának mértéke*, valamint külön a *porc* és a *csontkárosodás* mértéke alapján történt. Mind a négy paramétert 0-tól 3-ig terjedő skálán pontoztunk, az egyes pontokat összeadtuk,

így minden mintára, ezáltal minden csoportra, egy összetett artritisz pontszámot kaptunk mely érték 0 és 12 közé eshetett.

A plazma szomatosztatin koncentrációjának meghatározása:

A kísérlet végén patkányonként 4 ml vérmintát vettünk szív punkcióval mély altatásban EDTA-t és aprotinint tartalmazó jégbehűtött csövekbe. Centrifugálást követően a plazmák peptid tartalmát abszolút alkohollal extraháltuk, a felülúszót nitrogén áram alatt beszárítottuk és RIA-pufferben visszaoldottuk. A plazma szomatosztatin-szerű immunreaktivitását RIA módszerrel határoztuk meg.

Statisztikai értékelés:

Az ödéma, allodinia/hiperalgèzia eredmények statisztikai elemzésére két utas ANOVA-t követően Bonferroni-féle módosított t-tesztet használtunk. Az összetett artritisz score és a peptid-koncentrációk elemzése során a nem-parametrikus, Mann-Whitney U tesztet alkalmaztuk. Minden esetben a 0,05 alatti p-értéket tekintettük szignifikáns különbségnek a vizsgált csoportok között.

### 3. Eredmények:

3.1. A kapszaicin-érzékeny rostok és a belőlük felszabaduló szomatosztatin szerepe krónikus ízületi gyulladásos patkánymodellben:

Kontroll, előkezeletlen állatokban a CFA-val kezelt láb fokozatosan duzzadt, a 8. napon elérte a maximális 60%-ot, a térfogat  $0.73 \pm 0.02 \text{ cm}^3$ -ról  $1.18 \pm 0.13 \text{ cm}^3$ -re növekedett. Az ellenoldali lábon kisebb mértékű, csupán 16-18% ödéma volt tapasztalható. A kapszaicin-érzékeny afferens rostok RTX-előkezeléssel történő inaktivációja után az ödéma a teljes 21 napos kísérleti periódus alatt nagyobb volt, a naponta alkalmazott C-SOM injekció, amely a szomatosztatin hatásait mind az öt sst receptoron gátolja, az RTX-előkezeléshez hasonló mértékben fokozta a lábduzzadást.

A kontroll állatokban a CFA kezelés hatására a mechanonociceptív küszöb a CFA-val kezelt lábon jelentősen, mintegy 25-30%-kal csökkent, míg az ellenoldali lábon csupán 5-7%-kal. Az RTX-előkezelés és a C-SOM-kezelés egyaránt mindkét lábon szignifikánsan növelte az allodiniát a teljes 21 napos kísérleti periódus alatt.

A szövettani metszeteken látható, hogy a patkányok CFA-val kezelt baloldali ízületét roncsolja az egyre növekvő szinoviális pannusz. Az ízületi üreg kiszélesedett, a szinoviális

kötőszövet mononukleáris sejtekkel sűrűn infiltrált, a porcszövet nagymértékben lepusztult és erőteljes, masszív csontkárosodás figyelhető meg. Az ellenoldali ízületekben kisebb mértékű gyulladással elváltozások láthatók, porc-és csontkárosodások ritkán jelentkeztek, a mononukleáris sejt-infiltráció jelentősen enyhébb, néhol a szinoviális szövet megvastagodott. Az RTX-szel előkezelt és C-SOM-kezelt patkányok bal tibiotarzális ízületében a CFA hatására sokkal kifejezettebb szinoviális hiperplázia, erőteljesebb megvastagodás és mononukleáris sejtes infiltráció, valamint nagyobb mértékű porckárosodás és előrehaladt csontpusztulás látható. Mindkét csoportban az ellenoldali ízületekben tapasztalt gyulladással járó károsodások is sokkal intenzívebbek. Az arthritisz pontszám eredményei is alátámasztották, hogy mind az RTX-előkezelés, mind a C-SOM-kezelés szignifikánsan súlyosbította az ízületi gyulladást.

A plazma SOM-szerű immunreaktivitása a CFA-injekciót követően folyamatosan emelkedett, a 21. npra elérte a négyszeres, maximális értéket. Az RTX-előkezelés a gyulladás során történő SOM felszabadulást szignifikánsan csökkentette, a bazális szint nem változott.

### 3.2. TT-232-kezelés hatása a CFA-val kiváltott krónikus ízületi gyulladásra:

A TT-232 dózisfüggő módon csökkentette a CFA-val kiváltott lábödémát, a legnagyobb dózis 50%-os gátlást okozott a CFA-val kezelt lábon. A kontroll csoportban mért kb. 30%-os mechanikai allodiniát a nagyobb TT-232 dózisok kivédtek, sőt, meglepő módon küszöbemelkedést okoztak. Az ellenoldalon a duzzadás és a hiperalgézia teljesen meg is szűnt. A legnagyobb dózissal kezelt patkányok tibiotarzális ízülete jelentősen enyhébb gyulladással jelezte a tüneteket. A szinoviális duzzanat, a limfocita-akkumuláció és a porcdestrukció csökkent, csontkárosodás egyáltalán nem jött létre. Mindezt alátámasztja az összetett arthritisz pontszám is, amely mindkét lábon szignifikánsan kisebb volt, mint az oldószerrel kezelt kontroll csoportban. A teljes kísérleti periódus alatt napi kétszer i.p. injektált TT-232 dózisfüggő módon gátolta a plazma szomatosztatin-szerű immunreaktivitásának CFA-val kiváltott emelkedését. A legnagyobb dózis a bazális értékre csökkentette a szomatosztatin koncentrációt.

### 3.3. CFA-val kiváltott lábduzzadás, mechanikai hiperalgézia és szövettani elváltozások TRPV1<sup>+/+</sup> és TRPV1<sup>-/-</sup> egerekben:

Vad egerekben a kezelt oldalon a lábduzzadás folyamatosan növekedett, a 16. napon elérte a maximális duzzadást (130%-os duzzanat a kiindulási értékhez képest), az ellenoldali lábon kisebb ödéma alakult ki (30%). A TRPV1<sup>-/-</sup> egerek esetében mindkét oldalon az első mérési

naptól kezdődően mindvégig szignifikánsan kisebb duzzadás alakult ki a teljes kísérleti periódus alatt (maximum 80%-os duzzanat a kezelt és 15% az ellenoldali lábon).

A mechanonociceptív küszöb a vad-típusú állatoknál a CFA-val kezelt lábon 45-50%-kal csökkent, míg az ellenoldalon csupán 10-15%-os hiperalgémia alakult ki. Ezzel szemben a TRPV1<sup>-/-</sup> egerek küszöbe csak 30-35%-os csökkenést mutatott a kezelt lábon, míg az ellenoldalon nem jött létre hiperalgémia.

A szövettani metszeteken az ép ízületi szerkezettel összehasonlítva a vad egerek CFA-val kezelt tibiotarzális ízületeiben nagymértékű a patkányokon megfigyelt elváltozásokhoz hasonló szöveti károsodás volt megfigyelhető. A TRPV1<sup>-/-</sup> egerekben jelentősen kisebb mértékű porcdestrukció volt tapasztalható csontkárosodás nélkül, valamint a szinoviális szövet megvastagodása és mononukleáris sejtekkel történő infiltráltsága is valamivel enyhébb volt, ebből adódóan az összetett artritisz pontszám szignifikánsan alacsonyabb ( $7,8 \pm 1,1$  vs.  $4,6 \pm 1,2$ ).

3.4. A desArgHOE-140, HOE-140, az NDGA és az indometacin hatása a CFA-val kiváltott lábduzzadásra, hiperalgémiaira és szöveti elváltozásokra vad-típusú és TRPV1<sup>-/-</sup> egerekben:

Vad egerekben a bradykinin B<sub>1</sub> receptor antagonistája desArgHOE-140 nem volt szignifikáns hatással sem a CFA-indukált ödémára, sem a mechanikai hiperalgémiaira, és nem befolyásolta jelentős mértékben az összetett artritisz pontszámot sem. A bradykinin B<sub>2</sub> receptor antagonistája HOE-140 ezzel szemben 30-40%-os gátlást okozott az ödémában és a hiperalgémiaiban is a teljes kísérleti periódus alatt, a szövettani összpontszámot pedig 55%-kal csökkentette. A nem-szelektív lipoxigenáz gátló NDGA 40-50%-os, míg a ciklooxygenáz-gátló indometacin 60-80%-os gátlást okozott a gyulladásos hiperalgémiaiban. Az ödémát az NDGA 25-30%-kal, az indometacin 40-55%-kal csökkentette, az artritisz pontszámot mindkét anyag szignifikánsan, 40%-kal és 65%-kal gátolta.

A TRPV1<sup>-/-</sup> csoportban az NDGA és a HOE-140 nem befolyásolta egyik gyulladásos tünetet sem. A bradykinin B<sub>1</sub> receptor antagonistája desArgHOE-140 kezelést elhagytuk a knockout csoportban miután a vad állatokban sem fejtett ki semmilyen statisztikailag mérhető hatást. Az indometacin viszont itt is 50-60%-kal csökkentette a hiperalgémiait, 20-30%-kal az ödémát. A vad állatokkal ellentétben az indometacin a TRPV1<sup>-/-</sup> egereknél nem csökkentette az ödémát a kezelés kezdeti szakaszában, az első jelentős gátlás a CFA-adást követő 11. napon volt megfigyelhető. Később mind a duzzadás gátló, mind az antihiperalgetikus hatások kisebbek voltak, mint a vad típusú csoportban. Gyulladásos szövettani elváltozást nem tapasztaltunk TRPV1<sup>-/-</sup> egerekben az NDGA és a HOE-140 kezelt csoportokban az



oldószerrel kezelt knockout egerekhez képest, míg az indometacin kezelés 40%-os összetett artritisz pontszám csökkenést eredményezett.

#### 4. Megbeszélés, következtetések:

Krónikus artritisz patkánymodelljében a szérum szomatosztatin szintjének mérésével közvetlen bizonyítékot szolgáltatunk, hogy a kapszaicin-érzékeny primér szenzoros neuronok gyulladásszerű stimulussal aktiválódó perifériás végződéseiből szomatosztatin szabadul fel (4 szerez koncentráció mérhető a kiindulási értékhez képest) és a szisztémás keringésbe jut. A kapszaicin-érzékeny afferensek RTX-előkezeléssel történő inaktivációja után a szomatosztatin felszabadulás nagymértékben csökken. Krónikus artritiszben valószínűleg a különböző gyulladáskeltő mediátorok aktiválják az ízületek kapszaicin-érzékeny afferensein lévő receptorokat, ioncsatornákat. Ennek következtében SOM szabadul fel, mely a keringésbe jutva szisztémás gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatást fejt ki. A felszabaduló SOM funkcionális jelentőségét, azaz szisztémás gyulladásgátló és antinociceptív hatását igazolja, hogy a nem-szelektív sst receptor antagonistá C-SOM-kezelés a krónikus artritisz tüneteit az RTX-előkezeléshez hasonlóan súlyosbítja. Ezen eredményeink krónikus ízületi gyulladásban is bizonyítják tehát a kapszaicin-érzékeny afferensek protektív szerepét és a neurális eredetű SOM által közvetített endogén ellenregulációs mechanizmust. Mindezek alapján a SOM ígéretes lehet a krónikus artritisz kezelésében, néhány perces plazma felezési ideje és mind az öt sst receptorhoz való kötődése következtében kifejtett széles mellékhatás-spektruma miatt azonban nem lehet potenciális gyógyszerjelölt. Stabil szintetikus szomatosztatin analógok, elsősorban nem-peptid származékok, amelyek gyulladáscsökkentő és analgetikus hatásokkal rendelkeznek, azonban a hormonszekréciókat gátló mellékhatásokkal nem, új antireumatikum-csoport kifejlesztésére is lehetőséget nyújthatnak.

Ezekre az eredményekre alapozva a továbbiakban az sst<sub>1</sub>/sst<sub>4</sub> receptor agonista, endokrin mellékhatásoktól mentes TT-232 hatását vizsgáltuk a krónikus ízületi gyulladás patkánymodelljében. A lábduzzadás kb. felére csökkent, a hiperalgédia pedig hipoalgéziává változott napi 2x400 µg/kg i.p. TT-232 hatására. Ezzel az analóggal kezelt állatokban a gyulladásszerű szövettani elváltozások is számottevően mérséklődtek, csupán kismértékű pannusképződés, gyulladásszerű sejtes infiltráció és minimális porckárosodás volt megfigyelhető, de csontszöveti pusztulás jelei egyáltalán nem mutatkoztak.

Második ízületi gyulladás vizsgálatára irányuló kísérletsorozatunkban az eredetileg Lewis patkányban kidolgozott CFA-indukálta krónikus artritisz modellt egérre adaptáltuk. Bizonyítottuk, hogy e modell jól működik ebben a fajban is, hiszen a CFA kezelés oldalán

130%-os lábduzzadást és 50%-os mechanikai ingerküszöb csökkenést (hiperalgéziát) tapasztaltunk a kezelés előtti értékekhez viszonyítva.

A TRPV1<sup>-/-</sup> egércsoportokban vizsgálva a CFA-indukálta krónikus ízületi gyulladással elváltozásokat és a következményes hiperalgéziát, egyértelműen megállapítható, hogy a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződésekre lokalizálódó TRPV1 receptor hiánya mind a kezelt, mind a kezeletlen oldalon jelentősen csökkentette ezeket a paramétereket. Eredményeink szolgáltatták az első bizonyítékot arra vonatkozóan, hogy a TRPV1 receptor fontos szabályozó szerepet játszik krónikus ízületi gyulladásban és mechanikai hiperalgéziában is. A TRPV1 receptor aktivációja során felszabaduló neuropeptidok eredően fokozzák a krónikus ízületi gyulladás súlyosságát.

A kísérlet második részében azt vizsgáltuk, hogy a TRPV1 receptort potenciálisan aktiváló gyulladással mediátorok közül melyeknek van leginkább szerepe a krónikus ízületi gyulladás tüneteinek ezúton való súlyosbításában. Előzetes irodalmi adatok tanulmányozása alapján a gyulladással felszabaduló bradykinin, lipoxigenáz és ciklooxygenáz enzimettermékek hatásait vizsgáltuk. Fontos hangsúlyozni, hogy nem arra voltunk kíváncsiak, hogy melyik gyulladással mediátor kiiktatása csökkenti legnagyobb mértékben a vizsgált tüneteket, hanem, hogy a szer vad csoportban kiváltott gyulladással és fájdalomcsökkentő hatásához hogyan viszonyul a knockout állatokban kiváltott tüneteket enyhítő hatása. A lipoxigenáz enzim gátló nordihidroguarénsavval (NDGA) kezelt vad-típusú állatoknál szignifikáns csökkenés alakult ki az ízületi gyulladással és fájdalomküszöb tekintetében már a 2. naptól. Ezzel szemben a TRPV1 KO egereknél azonban a gyulladással csökkentő és antinociceptív hatás szinte teljesen hiányzott. Vad típusú állatok esetében a bradykinin B2 receptor antagonistája HOE-140-nel naponta történő kezelés gátolta az ödéma és a mechanikai hiperalgézia kialakulását, de a TRPV1 receptor KO egerek esetében nem váltotta ki ugyanezt a hatást. Ezek a megfigyelések összhangban az in vitro irodalmi adatokkal azt mutatják, hogy az ízületi gyulladással során felszabaduló bradykinin B2 receptorokon hatva szenzitizálja a perifériás szenzoros idegvégződéseken lévő TRPV1 receptorokat. A bradykinin B1 receptor antagonistája desArgHOE-140-nel való napi kezelés nem okozott statisztikailag szignifikáns gátlást a vad csoportban sem az ödéma kialakulásában, a szövettani változásokban sem a hiperalgéziában. Ezért levonhatjuk azt a következtetést, hogy a B1 receptorok nem játszanak jelentős krónikus ízületi gyulladással körülmények között egérmódelben. A ciklooxygenáz enzimet gátló indometacin jelentősen csökkentette (a vizsgált anyagok közül a legnagyobb mértékben) az ízületi gyulladással és a vele járó hiperalgéziát mind a vad típusú, mind a TRPV1 KO egereknél az oldószerekkel kezelt csoporthoz viszonyítva, de a gátlás mértéke

kiseb volt a TRPV1 receptor génhiányos egerek esetében, különösen a krónikus gyulladás kezdeti fázisában. Jelen eredményeink alapján elmondható, hogy a gyulladt szövetből felszabaduló prosztoglandinok a TRPV1 receptor aktiválásán/szenzitiz l s n keresztül is hozzájárulnak a gyulladásos ödéma fokozódásához.

A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződésekre lokalizálódó TRPV1 receptor hiánya tehat a teljes idegvégződés inaktiválásával ellentétben nem fokozta, hanem jelentősen csökkentette a krónikus ízületi gyulladást és a következményes hiperalgéziát. Ennek a látszólagos ellentmondásnak a magyarázata lehet az, hogy az ízületi afferensekb l a gyulladáskeltő tachikininek és CGRP, valamint a gyulladásgátló szomatosztatin más receptorok/ioncsatornák aktivációjával szabadulnak fel. A gyulladáskeltő neuropeptidok felszabadulása valószínűleg elsősorban a TRPV1 receptor aktivációja következtében történik. E folyamatok hiánya TRPV1<sup>-/-</sup> egerekben jelentősen gátolja a gyulladást és következményes hiperalgéziát. A SOM felszabadulásában ezzel szemben eredményeink alapján valószínűleg más mechanizmusok játszanak szerepet. Ezt az elképzelést alátámasztja az a tény, hogy e szenzoros neuropeptidok csak részben kolokaliz ltan fordulnak elő a kapszaicin-érzékeny afferensekben, a szomatosztatin tartalmú v gz d seken lehetséges, hogy nem a TRPV1, hanem pl. TRPA1, bradykinin receptorok, purinoceptorok stb. expressziója dominál.

Eredményeink alapján két célmolekulát is azonosítottunk, a TRPV1 ioncsatornát, valamint a szomatosztatin sst<sub>4</sub>/sst<sub>1</sub> receptort. Szelektív TRPV1 antagonisták, illetve sst<sub>4</sub>/sst<sub>1</sub> agonista vegyületek új perspektívákat jelenthetnek a krónikus ízületi gyulladás farmakoter pi j ban.

## ** J EREDMÉNYEINK ÖSSZEFOGLALÁSA**

1. Kísérleteink eredményeképp kijelenthetjük, hogy a TRPV1 receptor és a CGRP jelenléte egyértelmű protektív szerepet tölt be a szkleroderma patomechanizmusában. CGRP receptor agonisták pedig terápiás lehetőséget jelenthetnek a szkleroderma kezelésében a jövőben, de természetesen a lehetséges mellékhatásokkal is számolni kell.

2. Elsőként bizonyítottuk, hogy a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződések krónikus ízületi gyulladásban protektív szerepet játszanak a belőlük felszabaduló és keringésbe jutó szomatosztatin közvetítésével.

3. A stabil, szintetikus heptapeptid sst<sub>4</sub>/sst<sub>1</sub> receptor agonista TT-232 hatékonyan gátolja a krónikus ízületi gyulladást (duzzadást és szövettani károsodást egyaránt), valamint a gyulladáshoz mechanikai allodiniát, ezért ígéretes új perspektívát jelenthet gyógyszerfejlesztési szempontból is.

4. Bizonyítékokat szolgáltatunk, hogy a kapszaicin-érzékeny afferenseken expresszáldó TRPV1 ioncsatorna elősorban bradykininnel és prosztaglandinokkal történő szenzitizációja és lipoxigenáz-termékekkel történő aktivációja következményeképpen -az idegvégződés egészével ellentétben- fokozza a krónikus ízületi gyulladást és allodiniát. Ennek alapján szelektív TRPV1 receptor antagonisták ugyancsak hatékony, új farmakoterápiás lehetőséget nyújthatnak artritisz kezelésére.

## **AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK**

Helyes Zs, **Szabó, Á**, Németh J, Jakab B, Pintér E, Bánvölgyi Á, Kereskai L, Szolcsányi J. Anti-inflammatory and analgesic effects of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model of the rat. *Arthr. Rheum.*, 2004;50: 1677-1685. (IF: 7.41; FC: 29)

**Szabó, Á**, Helyes Zs, Sándor K, Bite A, Pintér E, Németh J, Bánvölgyi Á, Bölskei K, Elekes K, Szolcsányi J. Role of TRPV1 receptors in adjuvant-induced chronic arthritis: in vivo study using gene-deficient mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005;314: 111-119. (IF: 4.1; FC: 26)

**Szabó Á**, Czirják L, Sándor Z, Helyes Zs, László T, Elekes K, Starr A, Brain S, Szolcsányi J, Cömpöly T, Pintér E. Investigation of sensory neurogenic components in bleomycin-induced scleroderma model using TRPV1 receptor and CGRP knockout mice. *Arthr. Rheum.* 2008;58: 292-301. (IF: 7.68; FC: 7)

**Az értekezés alapját képező publikációk összesített impact faktora: 19.19**

**Az értekezés alapját képező publikációkra kapott összes független citáció: 62**

## **EGYÉB EREDETI KÖZLEMÉNYEK**

Szolcsányi J, Bölskei K, **Szabó Á**, Pintér E, Pethő G, Elekes K, Börzsei R, Almási R, Szűts, T, Kéri Gy, Helyes Zs. Analgesic effect of TT-232, a heptapeptide somatostatin analogue, in acute pain models of the rat and the mouse and in streptozotocin-induced diabetic hyperalgesia. *Eur. J. Pharmacol.* 2004;498: 103-109. (IF: 2.43; FC: 13)

Bölskei K, Helyes Zs, **Szabó Á**, Sándor K, Pethő G, Elekes K, Almási R, Pintér E, Szolcsányi J. Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain* 2005;117: 368-376. (IF: 4.31; FC: 44)

Varga A, Németh J, **Szabó Á**, McDougall JJ, Zhang C, Elekes K, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Zs. Effects of the novel TRPV1 receptor antagonist SB366791 in vitro and in vivo in the rat. *Neurosci. Lett.* 2005;385: 137-142. (IF: 1.9; FC: 33)

Jakab B, Helyes Zs, Varga, A, Bölskei K, **Szabó Á**, Sándor K, Elekes K, Börzsei R, Pintér E, Pethő. G, Németh J, Szolcsányi J. Pharmacological characterization of the novel TRPV1 receptor antagonist JYL1421 (SC0030) in vitro and in vivo in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 2005;517: 35-44. (IF: 2.48; FC: 16)

Sándor K, Elekes K, **Szabó Á**, Pintér E, Engström M, Würster S, Szolcsányi J, Helyes Zs. Analgesic effects of the somatostatin sst<sub>4</sub> receptor selective agonist J-2156 in acute and chronic pain models.

Eur. J. Pharmacol. 2006;539: 71-75. (IF: 2.52; FC: 5)

Helyes Zs, Pintér E, Németh J, Sándor K, Elekes K, **Szabó Á**, Pozsgai G, Keszthelyi D, Kereskai L, Engström M, Würster S, Szolcsányi J. Effects of the Somatostatin Receptor Subtype 4 Selective Agonist J-2156 on Sensory Neuropeptide Release and Inflammatory Reactions in Rodents.

Br. J. Pharmacol. 2006;149: 405-15. (IF: 3.83; FC: 8)

Németh J, Reglodi D, Pozsgai G, **Szabó Á**, Elekes K, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Zs. Effect of PACAP-38 on sensory neuropeptide release and inflammatory reactions in rats and mice.

Neuroscience 2006;143: 223-30. (IF: 3.43; FC: 2)

Helyes Zs, Elekes K, Nemeth J, Pozsgai G, Sándor K, Kereskai L, Börzsei R, Pintér E, **Szabó Á**, Szolcsányi J. Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 receptors in endotoxin-induced airway inflammation in the mouse.

Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 2007;292: L1173-81. (IF: 4.21; FC: 12)

Elekes K, Helyes Zs, Nemeth J, Sándor K, Pozsgai G, Kereskai L, Börzsei R, Pintér E, **Szabó Á**, Szolcsányi J. Role of capsaicin-sensitive afferents and sensory neuropeptides in endotoxin-induced airway inflammation and consequent bronchial hyperreactivity in the mouse.

Regulatory Peptides 2007;141: 44-54. (IF: 2.42; FC: 5)

Varecza Z, Elekes K, László T, Perkecz A, Pintér E, Sándor Z, Szolcsányi J, Keszthelyi D, **Szabó Á**, Sándor K, Molnár TF, Szántó Z, Pongrácz JE, Helyes Zs. Expression of the Somatostatin Receptor Subtype 4 in Intact and Inflamed Pulmonary Tissues.

J. Histochem. Cytochem. 2009;57: 1127-37. (IF: 2.81)

**Egyéb publikációk összesített impact faktora: 30.34**

**Egyéb publikációkra kapott összes független citáció: 138**

# KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban köszönöm Dr. Helyes Zsuzsannának és Dr. Pintér Erikának, témavezetőimnek, hogy bevezettek a kutatómunka világába, példát mutatva szakmai ismeretből, szorgalomból, odaadásból, valamint a tudományos munkán túl emberileg is rengeteget köszönhetek nekik.

Köszönöm Dr. Szolcsányi János professzornak, a Neurofarmakológia program vezetőjének, hogy a képzésben részt vehettem, és hogy rendkívül jó szakmai észrevételeivel és hatalmas tudásával mindig tudott segíteni a munkámban.

Köszönöm Dr. Sándor Zoltánnak és a molekuláris biológiai részleg dolgozóinak, Dr. Szőke Évának és Tóth Dánielnek, hogy velük dolgozhattam és a munkacsoport tagja lehettem.

Köszönöm Dr. Czirják László professzornak, hogy támogatta a munkám és számos szakmai tanáccsal járult hozzá kutatómunkám eredményességéhez.

Köszönöm Dr. Barthó Loránd professzornak, a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet vezetőjének, hogy kutatóként az intézetben dolgozhattam.

Köszönöm szobatársamnak Dr. Elekes Krisztiánnak, aki barátként még kellemesebbé tette a kutatással töltött időt.

Köszönöm közvetlen munkatársaimnak Dr. Pozsgai Gábornak, Dr. Sándor Katának, Dr. Kemény Ágnesnek, Dr. Bölcskei Katának továbbá a diákkörösöknek és az Intézet összes munkatársának a rengeteg segítséget, amit kaptam tőlük a munkám során.

Köszönöm Perkecz Anikónak a kiváló metszeteket, és Rabovszky Helgának az állatok előkészítését és a napi bleomycin injekció során nyújtott segítségét valamint Gáspár Attilának a számítógépes munkában kapott értékes tanácsokat.

Köszönöm a kísérletes munkában nyújtott nélkülözhetetlen segítséget az Intézet asszisztensnőinek, Zádor Csillának, Góglné Katinak, Zöldhegyiné Máriának, Buzásiné Annának, Bagoly Teréznek.

Köszönöm az Immunológiai és Biotechnológiai Intézet munkatársainak, elengedhetetlen segítséget nyújtottak az *in vitro* kísérletek beállításában.

Köszönöm az Orvosi Genetikai Intézet munkatársainak, hogy lehetőséget biztosítottak a PCR kísérletek megvalósításához.

Köszönöm Dr. László Teréziának, Dr. Kereskai Lászlónak a szövettani metszetek értékelését.

Köszönöm Dr. Susan Brainnek és munkacsoportjának a bleomycin-indukálta szkleroderma modell témakörben végzett a CGRP szerepét tisztázó kiegészítő kísérleteit.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak, hogy szeretetükkel, türelmükkel, megértésükkel és töretlen bizalmukkal mindvégig támogattak.