

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

Doktori (PhD) értekezés



Dr. Horváth Ádám István

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Neurofarmakológia Program

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

Témavezető: Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Pécs

2017

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
1. A tranziens receptor potenciál ankyrin 1 (TRPA1) és vanilloid 1 (TRPV1) receptorok, szerepük gyulladásban és fájdalomban, gyógyszerfejlesztési perspektívák	6
2. A szemikarbazid-szenzitív amin oxidáz (SSAO) szerepe gyulladásban és fájdalomban, kapcsolata a TRPA1 és TRPV1 receptorokkal	12
3. Az ízületi gyulladás, kezelési lehetőségei és nehézségei	16
4. A neuropátiás fájdalom mechanizmusai, terápiás kihívások	19
CÉLKITÚZÉSEK.....	21
KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK.....	22
1. KÍSÉRLETI ÁLLATOK.....	22
2. ETIKAI VONATKOZÁSOK	22
3. KÍSÉRLETI MODELLEK.....	22
3.1. CFA-indukált krónikus artritisz modell	22
3.2. K/BxN szérum-transzfer artritisz modell	24
3.3. Traumás mononeuropátia modell.....	26
3.4. Karragenin-indukált akut gyulladás modell	26
3.5. CFA-indukált akut gyulladás modell	27
3.6. Akut kemonocifenzív modellek	27
4. FARMAKOLÓGIAI MÓDSZEREK.....	28
4.1. SzV-1287 és LJP-1207 kezelés	28
4.2. Oxaprozin és diklofenák kezelés	29
5. VIZSGÁLATI MÓDSZEREK.....	29
5.1. Mechanonociceptív küszöbmérés	29
5.2. Lábtérfogat mérés.....	30
5.3. Térdátmérő mérés.....	30
5.4. Termonociceptív küszöbmérés.....	30
5.5. Hidegérzékenység meghatározása.....	31
5.6. Ízületi gyulladás súlyosságának meghatározása.....	31
5.7. Ízületi funkció megítélése	32
5.8. <i>In vivo</i> neutrofil mieloperoxidáz aktivitás mérés	32
5.9. <i>In vivo</i> plazmafehérje extravazáció mérés.....	32

5.10. Szöveti vizsgálat.....	33
5.11. Gyulladásos citokin koncentráció meghatározása	33
5.13. Sejtenyésztés	34
5.14. A porcképződés mértékének fénymikroszkópos detektálása	35
6. FELHASZNÁLT ANYAGOK	35
7. STATISZTIKAI ANALÍZIS	36
EREDMÉNYEK	37
1. A TRPA1 és TRPV1 receptorok szerepe ízületi gyulladás és fájdalom egérmodelljeiben	37
1.1. Eredmények	37
1.2. Új eredmények összefoglalása	47
2. Az SSAO szerepe ízületi gyulladás és fájdalom egérmodelljeiben	48
1.1. Eredmények	48
1.2. Új eredmények összefoglalása	59
3. A TRPA1 és TRPV1 receptorok és az SSAO kapcsolata ízületi gyulladás és fájdalom egérmodelljeiben	60
1.1. Eredmények	60
1.2. Új eredmények összefoglalása	68
MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK.....	69
IRODALOMJEGYZÉK	79
PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK	99
1. Az értekezés alapját képező eredeti közlemények	99
2. Egyéb eredeti közlemény	99
3. Kongresszusi szóbeli előadások	100
4. Kongresszusi poszter prezentációk	102
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	104

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

5-HT: 5-hidroxi-triptamin

12-HPETE: 12-hidroperoxi-eikozatetraénsav

ACh: acetyl-choline/ acetyl-kolin

AITC: allil-izotiocianát

anti-CCP: anti-ciklikus citrullinált peptid

APC: antigen presenting cell/antigén prezentáló sejt

ATP: adenosin-trifoszfát

B2: bradikinin 2 receptor

C-R: complement receptor/komplement receptor

CFA: complete Freund's adjuvant/komplett Freund adjuváns

CGRP: calcitonin gene-related peptide/kalcitonin gén-rokon peptid

COPD: chronic obstructive pulmonary disease/krónikus obstruktív tüdőbetegség

COX: ciklooxygenáz

DMARD: disease-modifying antirheumatic drugs/betegségmódosító antireumás szerek

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

Fc-R: Fc receptor

GPCR: G-protein coupled receptor/G-proteinhez kötött receptor

i.a.: intraartikuláris

IASP: International Association for the Study of Pain/Nemzetközi Fájdalom Társaság

ICAM-1: intracellular adhesion molecule-1/intracelluláris adhéziós molekula-1

ICG: indocyanine green/indocianin zöld

IFN γ : interferon γ

IL: interleukin

i.p.: intraperitoneális

i.pl.: intraplantáris

i.v.: intravénás

JIA: juvenilis idiopátiás artritisz

KC: keratinocyte chemoattractant/keratinocita kemoattraktáns

MAO: monoamin oxidáz

MHC: major histocompatibility complex/major hisztokompatibilitási komplex

MIA: monosodium iodoacetate/monojód acetát

MIP-2: macrophage inflammatory protein-2/makrofág gyulladásos protein-2

MPC: mononuclear phagocyte/mononukleáris fagocita sejt
 MPO: mieloperoxidáz
 NGF: nerve growth factor/ideg növekedési faktor
 NF κ B: nuclear factor κ B/nukleáris faktor κ B
 NK: natural killer/természetes ölősejt
 NKA: neurokinin A
 NKB: neurokinin B
 NOD: non-obese diabetic/nem-elhízott diabéteszes
 NSAID: non-steroid anti-inflammatory drugs/nem-szteroid gyulladáscsökkentő szerek
 PACAP: pituitary adenylate cyclase activating polypeptide/hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid
 PBS: phosphate buffered saline/foszfát pufferes sóoldat
 PCR: polimerase chain reaction/polimeráz láncreakció
 RA: reumatoid arthritisz
 RANKL: receptor activator of nuclear factor κ B ligand/nukleáris faktor κ B receptor aktivátor ligand
 RF: reuma faktor
 ROI: Region of Interest
 ROS: reactive oxygen species/reaktív oxigén gyökök
 RTX: reziniferatoxin
 s.c.: szubkután/subcutan
 S.E.M.: standard error of mean/átlag standard hibája
 SP: substance P/P-anyag
 SSAO: semicarbazide-sensitive amine oxidase/szemikarbazid-szenzitív amin oxidáz
 SST: somatostatin/szomatosztatin
 TCR: T cell receptor/T sejt receptor
 Th: T-helper sejt
 TNF- α : tumor nekrosis faktor- α
 Tol-R: Toll-like receptor/Toll-szerű receptor
 TrkA: tropomiozin receptor kináz A
 TRPA1: tranziens receptor potenciál ankyrin 1
 TRPV1: tranziens receptor potenciál vanilloid 1
 VEGF: vascular endothelial growth factor/vaszkuláris endotél növekedési faktor
 WT: wild type/vad típusú

BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1. A tranziens receptor potenciál ankyrin 1 (TRPA1) és vanilloid 1 (TRPV1) receptorok, szerepük gyulladásban és fájdalomban, gyógyszerfejlesztési perspektívák

Munkacsoportunk az 1970-es évek óta foglalkozik a vékony mielinhüvelyes (A δ -) és a mielinhüvely nélküli (C-) érző rostok egy sajátos alcsoportjának, az ún. kapszaicin-érzékeny érzőideg végződésének, illetve az ezeken lokalizálódó, TRP családba tartozó ionotróp receptorok kutatásával. Ebbe a receptor családba tartoznak a TRPA1 és TRPV1 receptorok is, amelyek az A δ - és C-rostokkal rendelkező neuronok sejttestein és végződésein kívül a hátsó gyöki és trigeminus ganglionokban (Caterina és mtsai., 1997; Story és mtsai., 2003), illetve nem neurális sejteken is funkcionálisan expresszálódnak. Utóbbiak közül mindkét receptort leírták már keratinocitákon (Southall és mtsai., 2003; Atoyan és mtsai., 2009), szinoviocitákon (Kochukov és mtsai., 2006), kondrocitákon (Somogyi és mtsai., 2015; Moilanen és mtsai., 2015) és limfocitákon is (Saunders és mtsai., 2007; Bertin és mtsai., 2016). A TRPV1 emellett hízósejteken (Stander és mtsai., 2004) és vaszkuláris simaizom sejteken (Kark és mtsai., 2008), míg TRPA1 fibroblasztokon (Hu és mtsai., 2009), makrofágokon (Chao és mtsai., 2008), endotél sejteken (Earley és mtsai., 2009), asztrocitákon (Shigetomi és mtsai., 2011) és oligodendrocitákon (Hamilton és mtsai., 2016) is expresszálódik. Számos kémiai irritáns, endogén mediátor és fizikai inger képes ezeket a receptorokat stimulálni.

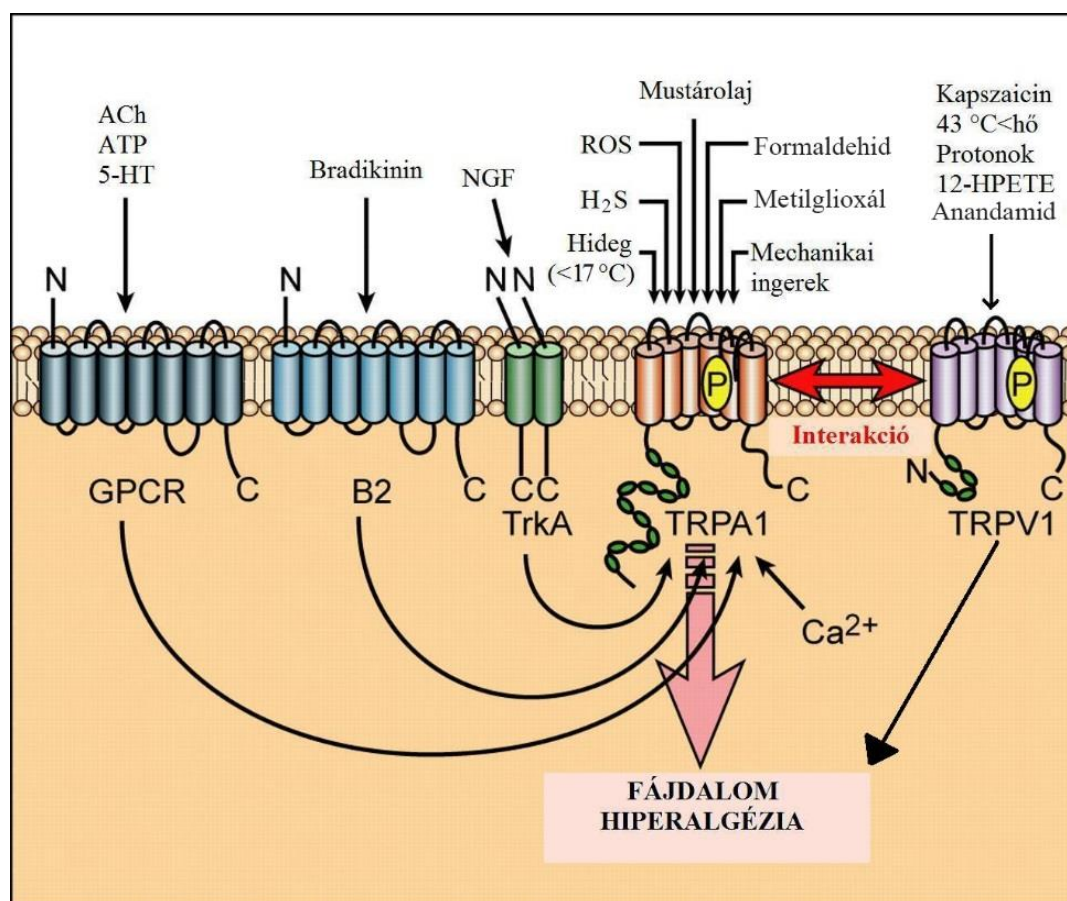
A **TRPV1** aktivátorai közül legismertebb a csípős paprika alkaloidja, a **kapszaicin** (8-metil-N-vanillil-6-nonenamid), amelynek hatásait évtizedekkel előbb ismerték, mint ahogy receptorát klónozták volna. Bár a népi gyógyászatban már korábban alkalmazott kapszaicinnal kapcsolatban az első tudományos feljegyzés az 1870-es évekből származik (Hőgyes, 1878), a kapszaicinnal kapcsolatos kutatások fellendülése igazából az 1960-as évekre tehető. Ekkor Prof. Jancsó Miklós szegedi élettanász és tanítványa, Szolcsányi János, aki később munkacsoportunkat is megalapította, munkájának köszönhetően derült fény a kapszaicin-deszenzitizáció jelenségére, illetve a kapszaicin-érzékeny érzőideg végződésének gyulladáskeltő hatására (Jancsó, 1960; Jancsó és mtsai., 1967). Az 1970-es években Szolcsányi János már feltételezte egy kapszaicin-receptor jelenlétét (Szolcsányi és Jancsó-Gábor, 1975, 1976), azonban a receptor azonosítása csak 1997-ben sikerült. Ekkor David Julius és munkacsoportja a receptort patkányból klónozták (Caterina és mtsai., 1997), majd ugyanez megtörtént tengerimalacból (McIntyre és mtsai., 2001) és emberből is (Hayes és mtsai., 2000). A receptor 838 aminosavból álló fehérje, amit 6 β -

redő szerkezetű transzmembrán domén épít fel. A csatornarégiót az 5. és 6. alegység közötti intracelluláris, hidrofób hurok alkotja, amelyek a membránban tetramerré és/vagy heteromerré rendeződve helyezkednek el. A receptor elnevezését az magyarázza, hogy nemcsak kapszaicin, hanem más vanilloid szerkezetű vegyületek is aktiválják, mint pl. a marokkói kutyatejben (*Euphorbia resinifera*) megtalálható reziniferatoxin (RTX), a fekete borsból származó piperin, a gyömbérben lévő zingeron és a szegfűszegben található eugenol (Caterina és mtsai., 1997). A TRP nagycsaládba 2002-ben sorolták (Gunthorpe és mtsai., 2002). Érdekes, hogy a TRPV család többi tagjára (TRPV2-6) nem hatnak vanilloid struktúrájú vegyületek. Ezek valójában csak vanilloid receptorszerű struktúrák, többségük epiteliális Ca^{2+} -csatorna (Gunthorpe és mtsai., 2002).

A TRPV1 polimodális szenzor funkcióval rendelkezik, hiszen kémiai irritánsokon kívül endogén mediátorok és fizikai ingerek is képesek aktiválni. Az endogén mediátorok közül legjelentősebbek a protonok ($\text{pH} < 6$) és az arachidonsav metabolitok, pl. az endokannabinoid N-arachidonoil-etanol-amin (anandamid), a 12-hidroperoxi-eikozatetraénsav (12-HPETE) és az N-oleoildopamin (Caterina és mtsai., 1997; Hwang és mtsai., 2000; Chu és mtsai., 2003). Számos proinflammatorikus mediátor szenzitizálja a TRPV1-et, többek között az egyik legerősebb fájdalomkeltő mediátor, a bradikinin (Shin és mtsai., 2002), a prosztaglandinok (Szállási és Blumberg, 1999; Chuang és mtsai., 2001) és a proteázok is (Amadesi és mtsai., 2004). A fizikai ingerek közül a fájdalmas intenzitású, 43°C feletti hő (Tominaga és mtsai., 1998) a legfontosabb, hiszen más hővel aktiválható struktúra nem ismert a szervezetben. A TRPV1, a többi TRP ioncsatornához hasonlóan nem sorolható be egyértelműen sem a ligandfüggő, sem a feszültségfüggő ioncsatornák közé, tulajdonképpen egy sokféle liganddal aktiválható termoszenzornak tekinthető. Ennek alapján a TRP csatornák önálló receptor típust képviselnek (Szolcsányi, 2008) **(1. ábra)**.

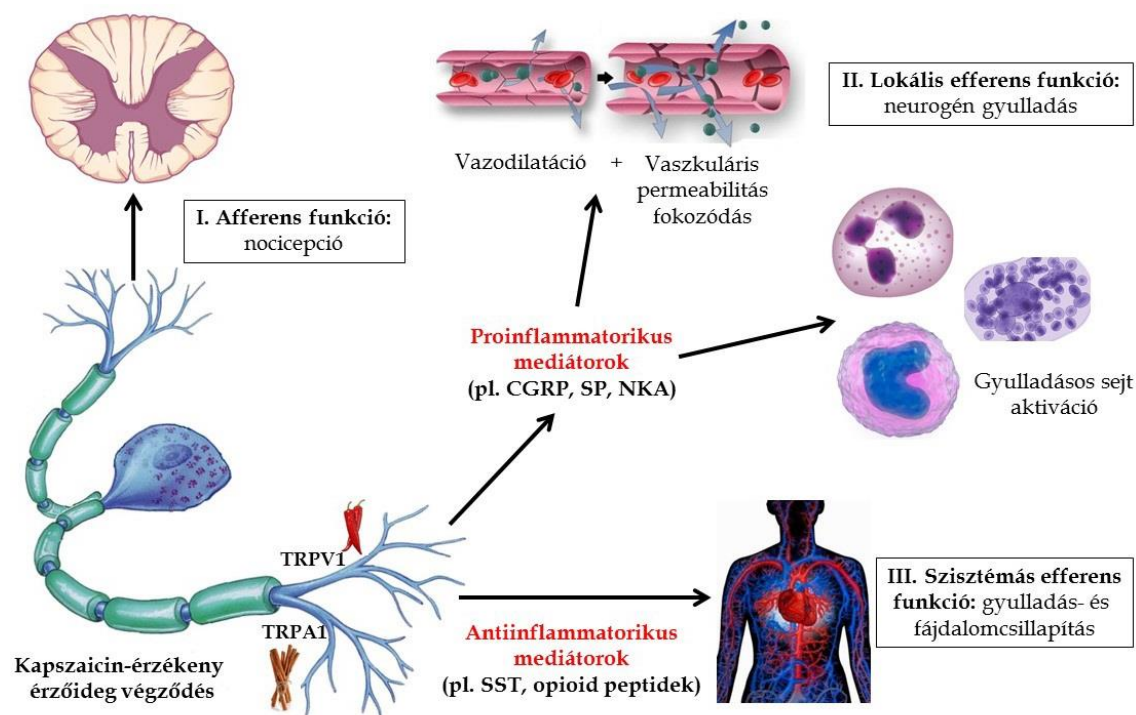
A **TRPA1** szerkezete megegyezik a TRPV1-ével, azzal a különbséggel, hogy egyedül az emlős TRP receptorok közül a legtöbb, szám szerint 17 ankyrin ismétlődéssel rendelkeznek az N-terminális régióban (Kwan és mtsai., 2006). A receptor nevét is ez magyarázza. Eredetileg hideg érzékelő receptorként írták le (Story és mtsai., 2003), azonban később kiderült, hogy a hidegérzékelésért valószínűleg nem kizárólag a TRPA1 felelős, csak hozzájárul a 17°C alatti hőmérséklet érzékeléséhez. A gyulladást és idegsérülést kísérő hideg allodínia (nem fájdalmas hideg inger által kiváltott fájdalomérzet) kialakulásában nagyobb szerepet tulajdonítanak neki (Obata és mtsai., 2005; Katsura és mtsai., 2006; Kwan és mtsai., 2006). Emellett számos exogén és

endogén ágens stimulálja a receptort. Az exogén agonisták közül jelentősek a növényi eredetű vegyületek, a mustárolajban található allil-izotiocianát (AITC) (Jordt és mtsai., 2004), a fokhagymában lévő allicin (Bautista és mtsai., 2005), a fahéjaldehid (Bandell és mtsai., 2004), továbbá a kipufogó gázokban és a dohányfüstben lévő akrolein (Bautista és mtsai., 2006). Az endogén aktivátorok mind a gyulladásos folyamatok és az oxidatív stressz során felszabaduló ágensek, mint pl. a 4-hidroxi-2-nonenal (Trevisani és mtsai., 2007), a hidrogén-szulfid (Miyamoto és mtsai., 2011), a 15-delta prosztaglandin J2 (Taylor-Clark és mtsai., 2008), illetve a **szemikarbazid-szenzitív amin oxidáz (SSAO) termékek** közül a formaldehid (McNamara és mtsai., 2007), a hidrogén-peroxid (Sawada és mtsai., 2008) és a metilglioxál (Eberhardt és mtsai., 2012). Gyulladásban betöltött kulcsszerepét szintén alátámasztja, hogy a TRPV1 receptorhoz hasonlóan a bradikinin és a szerotonin is képes érzékenyíteni a receptort (Bautista és mtsai., 2006; Wang és mtsai., 2008) (**1. ábra**).



1. ábra A TRPV1 és TRPA1 receptor szerkezete és aktivációs mechanizmusai. Rövidítések: 5-HT: 5-hidroxi-triptamin, 12-HPETE: 12-hidropoxi-eikozatetraénsav, ACh: acetil-kolin, ATP: adenozin-trifoszfát, B2: bradikinin 2 receptor, GPCR: G-proteinhez kötött receptor, NGF: idegi növekedési faktor, ROS: reaktív oxigén gyökök, TrkA: tropomiozin receptor kináz A, TRPA1: tranziens receptor potenciál ankyrin 1, TRPV1: tranziens receptor potenciál vanilloid 1. Forrás: Nilius és mtsai., Physiol Rev, 2007.

A TRPV1 és TRPA1 receptorokat expresszáló nociceptorok a perifériás afferensek egy sajátos alcsoportját képezik. Ezek az ún. **peptiderg, kapszaicin-érzékeny érzőideg végződés**, amelyek az A δ - és a C-rostok 40-50%-át teszik ki (Holzer, 1991). Különlegességük, hogy egyedülálló módon **hármass funkcióval** rendelkeznek, az afferens mellett lokális és szisztémás efferens funkciójuk is van (2. ábra).



2. ábra A kapszaicin-érzékeny érzőideg végződés hármass funkciója. Rövidítések: CGRP: kalcitonin gén-rokon peptid, NKA: neurokinin A, SP: P-anyag, SST: szomatosztatin, TRPA1: tranziens receptor potenciál ankyrin 1, TRPV1: tranziens receptor potenciál vanilloid 1.

A klasszikus afferens működés során a receptorok aktivációja következtében Na⁺ ionok áramlanak be az idegvégződésbe, így kialakul az akciós potenciál, tovaterjedésével pedig a fájdalomérzet (nocicepció). Emellett azonban Ca²⁺ influx is zajlik, amely gyulladás- és fájdalomkeltő neuropeptidok felszabaduláshoz vezet (pl. kalcitonin gén-rokon peptid: CGRP, P-anyag: SP, neurokinin A és B: NKA, NKB). A beidegzési területen a CGRP elsősorban artériás vazodilatációt okoz, a tachikininek (pl. SP, NKA, NKB) pedig a venulák érpermeabilitását fokozva plazmafehérje kiáramlást váltanak ki, illetve leukocita és hízósejt stimulációt idéznek elő. Ezt a folyamatot **neurogén gyulladásnak** nevezzük, amelyet a kapszaicin-érzékeny afferensek lokális efferens funkciójának következménye (Szolcsányi, 1984; Maggi és Meli, 1988). Az érzőideg végződéseknak van egy harmadik, szisztémás efferens funkciója is, aminek következtében szomatosztatin, endogén opioidok, hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) és galanin is felszabadul, amelyek a keringésbe jutva szisztémás gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatásokkal

rendelkeznek (Szolcsányi és mtsai. 1998a,b; Helyes és mtsai. 2000, 2004; Botz és mtsai., 2014, 2016b).

A kapszaicin-érzékeny érzőideg végződés által közvetített neurogén gyulladás és következményes fájdalom számos gyulladásos betegségben fontos szerepet játszik (pl. reumatoid arthritisz, asztma, pszoriázis, ekcéma, kontakt dermatitisz, migrén, gyulladásos bélbetegségek) (Helyes és mtsai., 2009). Mivel azonban jelenleg egyetlen gyógyszercsoport sem áll rendelkezésünkre, amely hatékonyan gátolná az említett betegségeknek ezt a komponensét, ezért óriási szükség van a patomechanizmusuk alaposabb megértésére és **új terápiás célpontok** azonosítására. Ilyen új gyulladás- és fájdalomcsillapítók támadáspontjai lehetnek a TRPV1 és TRPA1 receptorok is.

A **TRPV1** egy különleges célmolekula abból a szempontból, hogy nemcsak antagonistával, hanem nagy dózisu agonistával is gátolható a működése. Agonistái közül a kapszaicint (*Tinctura Capsici*) már évszázadok óta alkalmazták empirikusan ízületi gyulladás és fájdalom lokális kezelésére, azonban hatásmechanizmusára csak 1960-ban derült fény (Jancsó, 1960). Nagy dózisu kapszaicin kezelés hatására ugyanis az erre érzékeny érzőideg végződés deszenzibilizálódik, teljesen működésképtelenné válnak. A jelenség hátterében az excesszív Ca^{2+} beáramlás következtében kialakuló mitokondrium és citoplazma duzzadás áll (Szállási és Blumberg, 1999; Vyklicky és mtsai., 2008; Anand és mtsai., 2011). A kapszaicin szisztémás adagolásának gátat szab, hogy felborítva a szervezet hőszabályozását hipotermiát okoz (Hori, 1984; Szállási és Blumberg, 1999; Gavva és mtsai., 2007a). Topikális alkalmazása azonban biztonságos, amit már a klinikai gyakorlatban is kihasználnak, ugyanis 2009-ben törzskönyvezték a posztherpeszes neuralgia és HIV-asszociált neuropátiás fájdalom kezelésében használható Qutenza 8%-os kapszaicin tapaszt (Anand és mtsai., 2011). Emellett ígéretes klinikai eredmények születtek kapszaicin injekciós készítményével (Adlea: ALGRX-4975) műtét utáni neuropátiás fájdalom (Remadevi és Szallisi, 2008), illetve kapszaicin cisz-izomerét (civamid) tartalmazó krémmel és orrspray-vel oszteoartritiszes fájdalom (Schnitzer és mtsai., 2012) és cluster fejfájás kezelésében (Saper és mtsai., 2002).

A TRPV1 klónozását követően számos antagonista vegyületet is kifejlesztettek (Valenzano és mtsai., 2003; Doherty és mtsai., 2005; El Kouhen és mtsai., 2005; Gavva és mtsai., 2005; Swanson és mtsai., 2005; Xi és mtsai., 2005; Ognyanov és mtsai., 2006). Ezek közül több hatékonynak bizonyult *in vivo* gyulladásos fájdalom modellekben (Pomonis és mtsai., 2003; Gavva és mtsai., 2005; Honore és mtsai., 2005), sebészi incíziót követő fájdalomban (Honore és mtsai., 2005) illetve daganatos fájdalom modelljében is (Ghilardi és mtsai., 2005). Bár nagy reményeket fűztek a TRPV1 receptor

antagonistákhoz, a humán klinikai vizsgálatokban észlelt súlyos mellékhatás, a hipertermia megakadályozta az első generációs szerek klinikai alkalmazását (Szállási és mtsai., 2006; Gavva és mtsai., 2007b). Miután sikerült tisztázni ennek a nem kívánt hatásnak a hátterét (Garami és mtsai., 2010), modalitás-szelektív, második generációs hatóanyagok kerültek kifejlesztésre, amely biztonságosnak bizonyultak a preklinikai (Watabiki és mtsai., 2011; Reilly és mtsai., 2012) és a fázis I vizsgálatokban is (Gomtsyan és Brederson, 2015; Chiche és mtsai., 2016; Arendt-Nielsen és mtsai., 2016).

A **TRPA1** receptor, mint terápiás célpont a TRPV1 antagonistákkal kapcsolatos kezdeti sikertelenségek után került a kutatók figyelmének középpontjába. Kiderült, hogy a TRPV1-hez hasonlóan fontos szerepe van a neurogén gyulladásban (Trevisani és mtsai., 2007; Earley, 2012) és a nocicepcióban is (Bautista és mtsai., 2006; Kwan és mtsai., 2006; McMahon és Wood, 2006; McNamara és mtsai., 2007), anélkül, hogy befolyásolná a hőszabályozást (Chen és mtsai., 2011). Fájdalom transzmisszióban betöltött kulcsszerepét erősítik meg azok az adatok is, melyek szerint a TRPV1-gyel funkcionális egységet képez a kapszaicin-érzékeny érzőideg végződéseken (Akopian és mtsai., 2007; Salas és mtsai., 2009; Patil és mtsai., 2010; Spahn és mtsai., 2014). A TRPA1 antagonisták számos gyulladásos és neuropátiás fájdalom modellben bizonyultak hatékonynak és biztonságosnak (Petrus és mtsai., 2007; Eid és mtsai., 2008; Wei és mtsai., 2009; da Costa és mtsai., 2010; Chen és mtsai., 2011; Bonet és mtsai., 2013; Trevisani és mtsai., 2013). Sőt, a közelmúltban egyikük (GRC 17536, Glenmark Pharmaceuticals, Mumbai, India) sikeresen teljesített egy diabéteszes neuropátiában szenvedő betegeken végzett fázis II vizsgálatot is (Chen és Hakos, 2015).

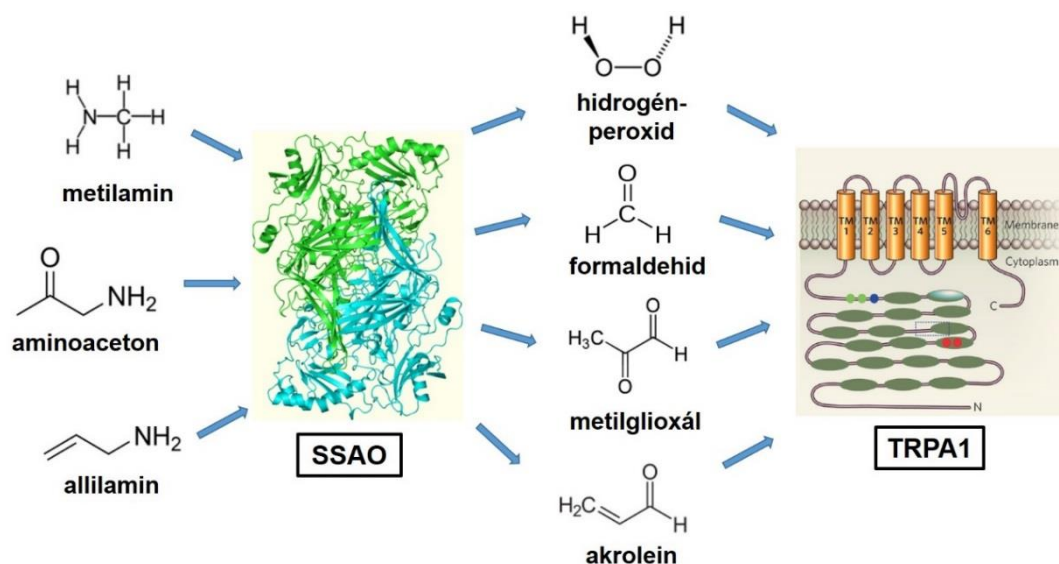
Antagonista vegyületeken kívül a receptorok *in vivo* funkciója génhiányos egerek segítségével is vizsgálható. TRPV1 receptor szerepét ezzel a módszerrel már számos akut és krónikus gyulladás és fájdalom modellben tanulmányozták (Caterina és mtsai., 2000; Szabó és mtsai., 2005; Bölcskei és mtsai., 2005; Barton és mtsai., 2006; Fernandes és mtsai., 2011). TRPA1 génhiányos egerekkel végzett kísérletekről azonban jóval kevesebb adat áll rendelkezésünkre, hiszen ezek előállítása jóval később történt, mint a TRPV1 génhiányos egereké (Bautista és mtsai., 2006). Főleg krónikus ízületi gyulladásban és fájdalomban betöltött pontos szerepének tisztázására van nagy igény, hiszen ezzel kapcsolatban mindössze három publikáció áll rendelkezésünkre az irodalomban (Fernandes és mtsai., 2011; Garrison és Stucky, 2014; Moilanen és mtsai., 2015). A munkánk egy részének egyik célja az volt, hogy megpróbáljuk ezeket a hiányosságokat pótolni, ezért TRPA1 szerepét különböző mechanizmusú krónikus artritisz modellekben és perifériás neuropátia egérmodelljében is megvizsgáltuk génhiányos egerek

felhasználásával. Emellett először szolgáltatunk adatokat génhiányos egerek segítségével TRPV1 receptor K/BxN szérumsztransfer artritisz modellben játszott szerepével kapcsolatban is.

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

Az SSAO vagy más néven vaszkuláris adhéziós protein-1 (VAP-1) az amin oxidázok családjába tartozó réztartalmú enzim, ami a primér aminok oxidatív dezaminációját végzi a szervezetben. A reakció során megfelelő aldehid, hidrogén-peroxid és ammónia keletkezik (Yu és mtsai, 2003). Leghíresebb rokonától, a monoamin oxidáztól (MAO) kofaktora, sejten belüli megoszlása, funkciója, szubsztrátjai és inhibitorai is megkülönböztetik. A szervezetben plazmában oldott vagy membránhoz kötött formában fordul elő, széles körű szöveti eloszlást mutat, azonban elsősorban az endotél sejtekben, a vaszkuláris simaizomban és az adipocitákban expresszálódik (Andrés és mtsai., 2001; Salmi és Jalkanen, 2001). Fiziológiai szerepe még nem teljesen tisztázott, az endogén aminok (pl. metilamin, aminoaceton) lebontása mellett az exogén aminok detoxifikálását végzi (Elliot és mtsai., 1989; Lyles, 1996), szerepe van a kötőszöveti mátrix kialakulásában és fenntartásában (Langford és mtsai. 1999), illetve a glükóz transzport szabályozásával az adipocita, a vaszkuláris simaizomsejt és a kondrocita differenciációban (Enrique-Tarancon és mtsai., 1998; El Hadri és mtsai., 2002; Filip és mtsai., 2016). Az egyik legfontosabb funkciójára a leukocita adhézióban és extravázációban szerepet játszó VAP-1 klónozása során derült fény, amikor igazolták a két molekula szekvencia azonosságát (Smith és mtsai., 1998). Ez alapján nem meglepő, hogy szignifikánsan emelkedett SSAO aktivitást detektáltak számos, főként gyulladásos eredetű patofiziológiai állapotban. Ezek közé tartoznak a gyulladásos máj-, izom- és szembetegségek (Kurkijärvi és mtsai., 1998; Olivé és mtsai., 2004; Luo és mtsai., 2013), a cukorbetegség (különösen annak szövődményei) (Boomsma és mtsai., 1999; Garpenstrand és mtsai., 1999), a pangásos szívelégtelenség (Boomsma és mtsai., 2000), az ateroszklerózis (Li és mtsai., 2009), a stroke (Sun és mtsai., 2014), az elhízás (Bour és mtsai., 2007), a krónikus vesebetegség (Lin és mtsai. 2008), a pszoriázis (Madej és mtsai., 2007), a szklerózis multiplex (Airas és mtsai., 2006), az Alzheimer-kór (Unzeta és mtsai., 2007) és az oszteoartritisz (Filip és mtsai., 2016). Ezek a megfigyelések felvetik biomarkerként való alkalmazhatóságát, amelyet eddig ateroszklerózisban (Karádi és mtsai., 2002; Aalto és mtsai., 2012), cukorbetegségben (Li és mtsai., 2011), stroke-ban (Hernandez-Guillamon és mtsai., 2010), májfibrózisban (Kurkijärvi és mtsai., 2000),

egyes szolid tumorokban (Yasuda és mtsai., 2011; Kemik és mtsai., 2010; Li és mtsai., 2014) és Alzheimer-kórban (Tong és mtsai., 2017) tanulmányoztak alaposabban. Számos kis molekulájú SSAO-inhibitorral végzett tanulmány igazolta, hogy az SSAO nemcsak adhézíós, hanem enzimatis funkciót is ellát a leukocita transzmigrációban (Salmi és mtsai., 2001a; Salter-Cid és mtsai., 2005; Wang és mtsai., 2006). A primér aminok dezaminációja során képződő szolubilis termékek közül az aldehidek közvetlen keresztkötéseket tudnak létrehozni a leukociták és az endotél sejtek között (Bogdan és mtsai., 2000), míg a hidrogén-peroxid egyéb endoteliális adhézíós molekula expresszióját képes fokozni (pl. P-szelektin, intracelluláris adhézíós molekula-1: ICAM-1) (Bradley és mtsai., 1993; Johnston és mtsai., 1996). A leukocita extravazációban játszott prominens szerepét emellett anti-SSAO antitestek (Salmi és mtsai., 2001b; Tokha és mtsai., 2001; Lalor és mtsai., 2002; Bonder és mtsai., 2005) és SSAO-deficiens egerek (Stolen és mtsai., 2005; Marttila-Ichihara és mtsai., 2006) segítségével is sikerült alátámasztani. Kutatócsoportunk vetette fel, hogy nemcsak a gyulladásban, hanem a **nocicepcióban** is fontos szerepet játszhat, hiszen az endogén (pl. metilamin, aminoacetoon) és exogén (pl. allilamin) aminok lebontása során képződött termékei (hidrogén-peroxid, formaldehid, metilglioxál, akrolein) ismert TRPA1 aktivátorok (Payrits és mtsai., 2016) (**3. ábra**).



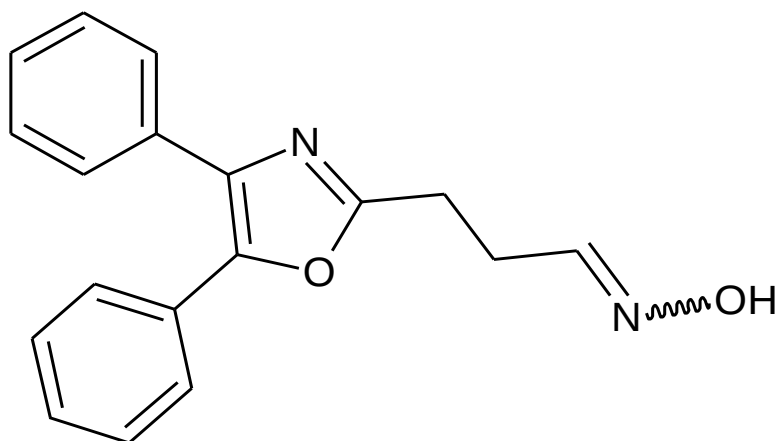
3. ábra SSAO és TRPA1 feltételezett kapcsolata. Az primér endogén (pl. metilamin, aminoacetoon) és exogén (pl. allilamin) aminok oxidatív dezaminációja során keletkező kémiai irritánsok (hidrogén-peroxid, formaldehid, metilglioxál, akrolein) aktiválják a peptiderg érzőideg végződéseken expresszáldó TRPA1-et.

Ahogy a fent említett *in vitro* és *in vivo* kísérleti eredmények is mutatják, az SSAO gátlásának terápiás értéke is lehet. Az **SSAO-gátlók** gyulladáscsökkentő hatásuk miatt többek között ateroszklerózis (Peng és mtsai., 2016), asztma (Schilter és mtsai., 2015),

krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD) (Jarnicki és mtsai., 2016), krónikus gyulladásos májbetegségek (Lalor és mtsai., 2007), angiogenezist gátló hatásuk miatt pedig időskori makula degeneráció (Noda és mtsai., 2008), diabéteszes retinopátia (Noda és mtsai., 2009) és tumorok (Marttila-Ichihara és mtsai., 2010) kezelésében jelenthetnek megoldást. Számos kis molekulájú SSAO-inhibítort fejlesztettek ki az elmúlt 15 évben terápiás céllal, azonban ezek kísérleti vagy klinikai alkalmazását sok tényező megakadályozta. Egyes szerek nem rendelkeztek megfelelő szelektivitással, hiszen más amin oxidázokat (pl. MAO) is gátoltak (Mátyus és mtsai., 2004) vagy kedvezőtlen fizikokémiai tulajdonságaik voltak, mint pl. a rossz oldhatóság vagy a toxikus szerkezet (Foot és mtsai., 2013). A gyógyszerjelöltek közül csak egy jutott el klinikai fázisig (PXS-4728A, Pharmaxis, Sydney, Ausztrália), amellyel jelenleg fázis II vizsgálatok zajlanak (Jarolimek és Charlton, 2015). Emellett még egy humán SSAO-ellenes monoklonális antitest (BTT-1023, Biotie, Turku, Finnország) jutott el klinikai vizsgálatokig, amely „árva” („orphan”) gyógyszer megjelölést kapott az Európai Unióban primér szklerotizáló kolangitisz kezelésére (Botz és mtsai., 2016a).

A kis molekulájú SSAO-inhibitorok között irreverzibilis és reverzibilis inhibitorokat különböztetünk meg (Foot és mtsai., 2013). Ezek közül előbbieket vizsgálták alaposabban, ide tartoznak többek között a hidrazin, az allilamin és az oxim vegyületek is. A hidrazinok közül LJP-1207 (N'(2-fenil-allil)-hidrazin hidroklorid) és BTT-2052 (1S,2S-2-(1-metilhidrazinil)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ol) is hatásosnak bizonyult számos rágszáló gyulladás modellben (Salter-Cid és mtsai., 2005; Marttila-Ichihara és mtsai., 2006), azonban potenciális toxicitásuk miatt gyógyszerjelöltként nem jöhetnek szóba (Foot és mtsai., 2013). A szintén hatékony gyulladásgátló, allilaminok közé tartozó LJP-1586 (Z-3-fluoro-2-(4-metoxibenzil) allilamin hidroklorid) terápiás alkalmazását a rossz oldhatóság, a PXS-4159A-ét (E-4-(4-amino-2-fluorobut-2-eniloxi)-N-ciklohexilbenzamid hidroklorid) pedig a szűk terápiás ablak korlátozza (Foot és mtsai., 2013). PXS-4681A-val (Z-4-(2-(amino-metil-3-fluoroalliloxi) benzenesulfonamid hidroklorid) és PXS-4728A-val kapcsolatban azonban biztató eredmények születtek légúti gyulladás különböző modelljeiben (Foot és mtsai., 2013; Schilter és mtsai., 2015; Jarnicki és mtsai., 2016). PXS-4728A (Pharmaxis, Sydney, Ausztrália) már fázis I klinikai vizsgálatban is biztonságosnak és jól tolerálhatónak bizonyult (Jarolimek és Charlton, 2015), a Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Németország) által, nem alkoholos szteatohepatitiszes (NASH) betegekben végzett fázis II vizsgálat eredményei 2017 első negyedében várhatóak.

Annak ellenére, hogy korábban leírták már néhány oxim vegyület növényi, bakteriális és állati eredetű réztartalmú amin oxidáz enzimekre, illetve humán szérum SSAO-ra kifejtett gátló hatását (Hiraoka és mtsai., 1988; Mlícková és mtsai., 2001), e vegyületek közül még egy sem került klinikai vizsgálatra. Az új, munkacsoportunk által szabadalmaztatott, komplex hatásmechanizmusú SSAO-gátló vegyület, az SzV-1287 (3-(4,5-dipheyl-1,3-oxazol-2-yl) propanal oxime) az ismert ciklooxygenáz (COX)-inhibitor oxaprozin oxim analógjaként szintén ebbe a csoportba tartozik (Mátyus és mtsai., 2010; Helyes és mtsai., 2014) (**4. ábra**).



4. ábra SzV-1287 (3-(4,5-diphenyl-1,3-oxazol-2-yl) propanal oxim) szerkezeti képlete

Az **SzV-1287** egy innovatív, metabolizmus-aktivált több támadáspontú vegyület, amely tulajdonképpen egy „aktív prodrug”. Az önmagában SSAO-gátló hatást biztosító szerkezetet úgy alakították ki, hogy abból szájon át történő adás után a gyomor savas pH-ján COX-gátló metabolit, oxaprozin képződik (Mátyus és Chai, 2015). Az új gyógyszerfejlesztési koncepció gyulladásmodellekben működött, az SzV-1287 gátló hatását karragenin-indukált akut és CFA-indukált krónikus gyulladásban is kimutatták (Tábi és mtsai., 2013). Kutatócsoportunk bizonyította továbbá, hogy SzV-1287 az SSAO-gátló hatástól függetlenül az érző neuronokon, valamint az érzőideg végződéseken lévő TRPA1 és TRPV1 receptorokon is gátló hatást fejt ki (Payrits és mtsai., 2016). Ez az eredmény felveti **potenciális fájdalomcsillapító** hatását, amit még egyetlen SSAO-gátló vegyülettel kapcsolatban sem bizonyítottak.

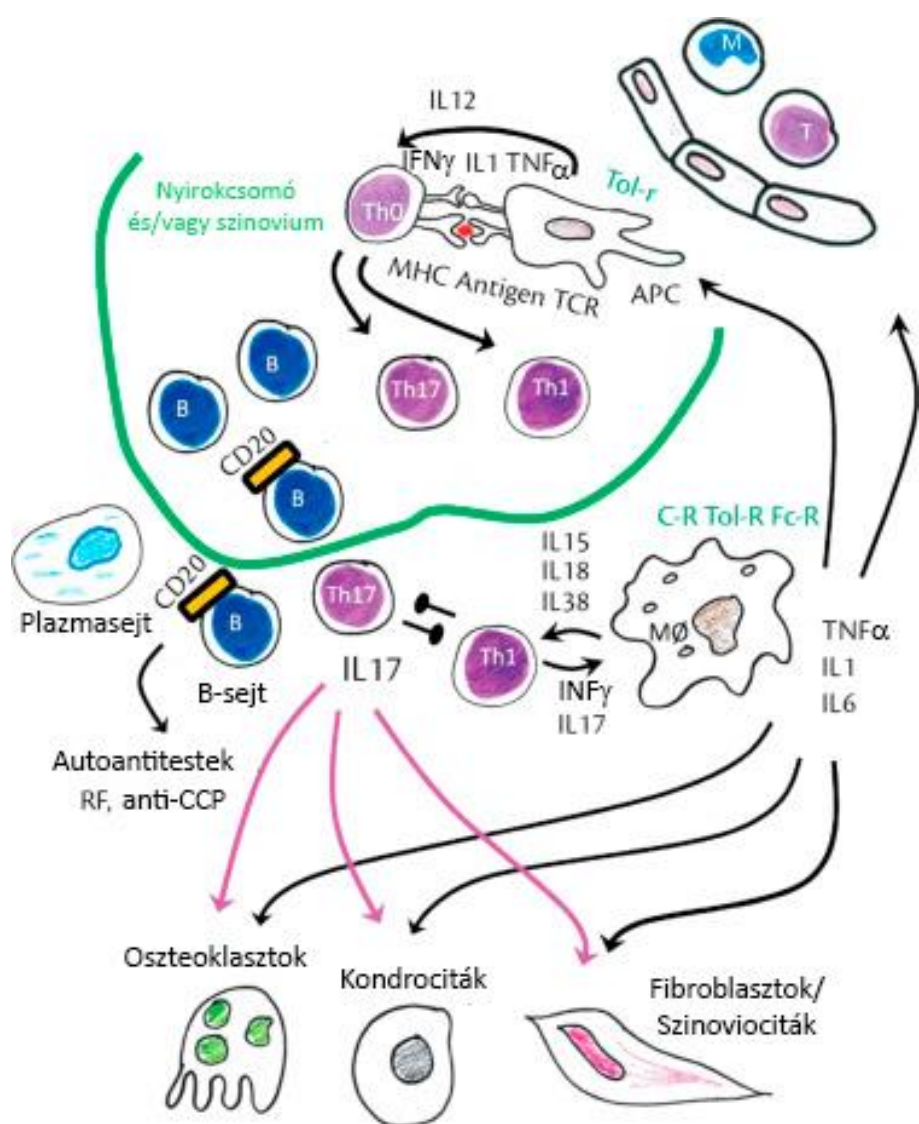
3. Az ízületi gyulladás, kezelési lehetőségei és nehézségei

A gyulladásos ízületi betegségek (arthritiszek) a reumatológiai kórképek egyik legnagyobb csoportját képezik, Magyarországon kb. 130-150 ezer beteget érintenek (Poór, 2014). Alapvetően infekciózus és nem infekciózus csoportra oszthatók. Az infekciózus arthritiszeket az ízületbe kerülő különböző kórokozók váltják ki, a folyamat akár szepszishez is vezethet. A nem infekciózus kórképek közé tartozik a reumatoid arthritisz (RA), a juvenilis idiopátiás arthritiszek (JIA), a szeronegatív spondilartropátiák és a köszvény. Közülük gyakoriságát és súlyosságát tekintve kiemelkedik az **RA**, amely egy ismeretlen eredetű, krónikus, progresszív sokízületi gyulladással és destrukcióval járó szisztémás autoimmun kórkép. Az egyik leggyakoribb mozgáskorlátozottságot okozó csont-vázizomrendszeri betegségnek számít (Tierney és mtsai., 2012), világszerte a lakosság kb. 1%-át (Gibofsky, 2012), Magyarországon 0,3-0,5%-át érinti (Szekanecz, 2004). Elsősorban a fejlett nyugati országok betegsége, gyakorisága északról délre haladva csökken (Alamanos és mtsai., 2006). A nőkben háromszor gyakrabban fordul elő, leggyakrabban a negyedik-ötödik évtizedben kezdődik. Nemcsak az életminőséget rontja jelentősen, hanem a várható élettartamot is megrövidíti 3-10 évvel (Alamanos és Drosos, 2005), ezért jelentős népegészségügyi problémának tekinthető.

Elsősorban a kéz és láb kisízületeinek szimmetrikus gyulladásával jár, de gyakran érintettek a nagyobb ízületek is. **Típusos tünetei** a mozgásra romló ízületi fájdalom és a gyulladásos jelekkel járó, 30-60 percet meghaladó reggeli ízületi merevség. Az ízületi érintettség mellett **extraartikuláris manifesztációk**, pl. bőr (reumás csomó, vaszkulitisz), szív-érrendszer (felgyorsult ateroszklerózis), tüdő (pleuritis, pneumonitisz, fibrózis), vese (amiloidózis), perifériás idegrendszer (alagút szindróma), csont (osteoporózis) és szem (episzkleritisz, szkleritisz, szikka szindróma) érintettség is előfordulhatnak (Young és Koduri, 2007).

RA pontos etiológiája és patomechanizmusa mind a mai napig nem ismert, ezért intenzív kutatások zajlanak ennek minél mélyebb felderítése érdekében. Jelenlegi ismereteink szerint **patogenezisét** négy szakaszra oszthatjuk (Burmester és mtsai., 2014). Az iniciális szakaszban különböző genetikai (HLA-DR1, HLA-DR4) és környezeti faktorok (életmód, dohányzás, egyes vírusfertőzések) hatására az immunrendszer működése kisiklik, a primér nyirokcsomókban és a szinoviumban különböző saját antigének bemutatását követően **autoreaktív T-sejt aktiváció** jön létre. A gyulladásos szakaszban a poliklonális T- és B-sejt aktivációt követően termelődő **citokinek** (pl. interferon γ : INF γ , interleukin-17: IL-17) és **autoantitestek** (pl. reuma faktor: RF, anti-ciklikus citrullinált peptid: anti-CCP) hatására a veleszületett immunrendszer sejtjei (neutrofilok,

hízósejtek, makrofágok) is aktiválódnak, amelyek elsősorban tumor nekrosis faktor- α (TNF- α) és IL-6 közvetítésével a szinoviális membrán önfenntartó gyulladását generálják (önfenntartó szakasz) (5. ábra). A késői destruktív szakaszban a krónikus szinoviális proliferáció ún. **pannuszképződéshez** vezet, amely egyrészt az ízületi részbe törve direkt, másrészt destruktív enzimeket (pl. mátrix metalloproteináz: MMP) termelve indirekt módon károsítja a porc felszínt és a porc alatti csontállományt. Ezt a folyamatot pedig tovább erősítik a különböző gyulladásos sejtek által termelt citokinek (pl. TNF- α , IL-1, IL-6, IL-17, NF κ B receptor aktivátor ligand: RANKL) (Burmester és mtsai., 2014; Furst és Emery, 2014; McNamee és mtsai., 2015).



5. ábra RA molekuláris patomechanizmusa. Rövidítések: anti-CCP: anti-ciklikus citrullinált peptid, APC: antigén prezentáló sejt, B: B-sejt, C-R: komplement receptor, Fc-R: Fc receptor, IFN γ : interferon γ , IL: interleukin, MHC: major hisztokompatibilitási komplex, M: monocita, MØ: makrofág, RF: reuma faktor, T: T-sejt, TCR: T-sejt receptor, Th: T-helper sejt, TNF α : tumor nekrosis faktor α , Tol-R: Toll-szerű receptor. Forrás: McNamee és mtsai., Eur J Pharmacol, 2015.

A jól feltérképezett immunológiai aspektus mellett a betegségnek van egy kevésbé ismert ún. **neurogén gyulladásos komponense** is, amelyet az ízületet gazdagon innerváló kapszaicin-érzékeny érzőideg végződések közvetítenek. Ezek a klasszikus afferens funkció révén nemcsak az ízületi tok feszülését és a fájdalmat közvetítik, hanem a lokális efferens funkció következtében a beidegzési területen gyulladás- és fájdalomkeltő neuropeptideket szabadítanak fel (Szolcsányi, 1984; Maggi és Meli, 1988), míg a szisztémás efferens funkció révén gyulladás- és fájdalomcsillapító neuropeptidek jutnak a keringésbe (Szolcsányi és mtsai. 1998a,b; Helyes és mtsai. 2000, 2004; Botz és mtsai., 2014, 2016b). Bár a gyulladásos betegségek közül reumatoid artritiszben írták le elsőként a neurogén gyulladás jelentőségét (Levine és mtsai., 1985a,b), az azóta eltelt három évtizedben számos fontos részeredmény ellenére a krónikus gyulladás és fájdalom pontos mechanizmusa, illetve a neuro-vaszkuláris és neuro-immun intrakciók szabályozó szerepe mind a mai napig nem tisztázott (Bozic és mtsai., 1996; Hood és mtsai., 2001; Steinman, 2004; Keeble és mtsai., 2005; Brogden és mtsai., 2005; Binstadt és mtsai., 2006; Helyes és mtsai., 2014; Stangenberg és mtsai., 2014; Botz és mtsai., 2014; Borbély és mtsai., 2015).

RA autoimmun betegség révén gyógyíthatatlan, azonban korai diagnózissal és korán elkezdett agresszív terápiával jól menedzselhető. **Kezelésében** nem gyógyszeres (pl. életmód, fizioterápia, balneoterápia) és gyógyszeres kezelési lehetőségek jöhetnek szóba. Utóbbiak között megkülönböztetünk tüneti és oki terápiát. Tüneti szerek között a nem szteroid (NSAID) és szteroid gyulladáscsökkentőket említhetjük, míg okai terápiaként betegségmódosító terápia (DMARD, első vonalban metotrexát, második vonalban szulfaszalazin vagy leflunomid) és/vagy szteroid, ezek hatástalansága vagy intolerancia esetén pedig célzott biológiai terápia jöhet szóba (elsősorban TNF- α gátló infliximab, etanercept vagy adalimumab, másodsorban T-sejt kostimuláció gátló abatacept vagy B-sejt gátló rituximab) (Smolen és mtsai., 2014; Singh és mtsai., 2016). Utóbbi szerek forradalmasították RA kezelését, segítségükkel viszonylag jó mellékhatás profil mellett a strukturális/radiológiai progresszió lassítható, a funkcionális rokkantság megelőzhető, azonban **a fájdalomra alig hatnak**. A betegek állandó fájdalomról panaszkodnak, amely jelentősen csökkenti életminőségüket, súlyos esetben depresszió kialakulásához is vezethet (Sharpe és mtsai., 2001). A jelenleg használt tüneti szerek is gyakran hatástalanok és a hosszú távú alkalmazás során súlyos mellékhatásokat okoznak (Aronson, 2009; Coutinho és Chapman, 2011). Ezért óriási szükség van az etiopatogenezis minél mélyebb megismerésére, az eddig elhanyagolt **neuro-immun és neuro-vaszkuláris interakciók** pontos feltérképezésére és ezáltal új terápiás célpontok

azonosítására. Új, potenciális gyulladás- és fájdalomcsillapítók támadáspontjai lehetnek például a kapszaicin-érzékeny érzőideg végződéseik mellett számos immunsejten és a vaszkulaturában is funkcionálisan expresszáldó TRPV1 és TRPA1 receptorok, illetve a TRPA1 aktivációban fontos szerepet játszó SSAO is.

4. A neuropátiás fájdalom mechanizmusai, terápiás kihívások

A neuropátiás fájdalom a szomatoszenzoros rendszer károsodásának vagy betegségének következtében kialakuló fájdalomállapot (Jensen és mtsai., 2011). **Prevalenciáját** illetően nem állnak rendelkezésünkre pontos epidemiológiai adatok, a Nyugat-Európai populációnak kb. 7-8%-át érintheti (Treede és mtsai., 2008; Bouhassira és mtsai., 2008). Elsősorban a középkorú és idősebb korosztály érintett, hiszen náluk sokkal gyakoribbak a neuropátia kialakulására hajlamosító betegségek (pl. cukorbetegség, daganatos betegség, stroke).

A neuropátiás fájdalmat okozó betegségeket az idegkárosodás anatómiai lokalizációja (centrális vagy perifériás) és etiológiája (traumás és nem traumás) alapján **négy csoportba** oszthatjuk: 1) perifériás traumás neuropátiák, 2) perifériás polineuropátiák (lehet pl. metabolikus, gyulladásos, tumoros, toxikus eredetű), 3) centrális fájdalom szindrómák (pl. posztstroke fájdalom, poszttraumás gerincvelői fájdalom), 4) egyéb kevert komplex fájdalom szindrómák (pl. komplex regionális fájdalom szindróma). Ezek közül munkánk során a perifériás traumás és a krónikus ízületi gyulladás késői fázisához kapcsolódó neuropátiás fájdalom egérmodellekben való vizsgálatával foglalkoztunk.

A fájdalomérzékelő apparatus károsodásának **két fő következménye** van. A szomatoszenzoros funkciók elvesztése ún. negatív, az abnormális, fokozott percepció pedig ún. pozitív tünetek kialakulásához vezet (Maier és mtsai., 2010). A negatív tünetek különböző szenzoros modalitások csökkenését (pl. tapintás- és hőérzékelés), hipesztéziát (csökkent fájdalomérzékelés) és vibráció érzés elvesztését foglalja magába. A leggyakoribb pozitív tünetek közé a paresztézia (spontán fellépő zsibbadás, hangyamászás-szerű, de nem fájdalmas érzés), a diszesztézia (spontán fellépő, égő, szúró, hasogató vagy áramütésszerű fájdalom), a hiperalgécia (enyhe fájdalominger kiváltotta heves fájdalom) és az allodínia (fájdalmatlan inger, pl. ruha érintése, enyhe hideg stimulus által kiváltott fájdalom érzés) tartozik (Bennett és mtsai., 2007; Komoly és Palkovits, 2010).

Kezelése hatalmas kihívások elé állítja az orvosokat, hiszen **patomechanizmusa** mind a mai napig nem teljesen ismert, így célzott terápiával sem rendelkezünk. Kialakulásában perifériás és centrális mechanizmusok egyaránt részt vesznek. Ezek közül a

legfontosabbak a károsodott és ép nociceptorokban létrejövő ektópiás aktivitás, a károsodott érzőneuronok fenotípus változása, a gerincvelői hátsó szarv reorganizációja, a spinális neurotranszmisszió megváltozása (serkentő folyamatok aktiválódása, gátlótónus csökkenése), a leszálló facilitáló pálya és a mikrogliák aktiválódása (Campbell és Meyer, 2006). Ezek a perifériás és centrális szentitizációs mechanizmusok hónapok, évek alatt irreverzibilis változásokat idéznek elő a központi idegrendszerben, amely megmagyarázhatja a terápirezisztens betegek nagy számát.

Terápiája elsősorban gyógyszeres, de alternatívaként nem gyógyszeres eljárások (pl. pszichoterápia, akupunktúra) és idegsebészeti technikák (pl. gerincvelői hátsóköteg vagy primér motoros kéreg stimuláció) is szóba jöhetnek (Dworkin és mtsai., 2007; Attal és mtsai., 2010; Komoly és Palkovits, 2010). Gyógyszeres kezelése során a konvencionális fájdalomcsillapítók közül az NSAID-ok alkalmazása kerülendő, hiszen számos vizsgálatban hatástalannak bizonyultak, míg opioidok csak limitált hatékonysággal rendelkeznek ebben a fájdalomállapotban. Helyettük elsősorban ún. adjuváns analgetikumokat használnak, azonban kb. a betegek felében ezekkel sem sikerül megfelelő fájdalomcsökkenést elérni, míg a terápiára reagáló betegek esetében a súlyos, gyakori mellékhatások miatt nem lehet hosszútávú alkalmazásukkal számolni. Az elsővonalbeli szer kiválasztását a fájdalom karaktere határozza meg. Villámcsapásszerű (neuralgiás) fájdalom esetén antiepileptikumokat, elsősorban a feszültségfüggő Na^+ -csatornákat blokkoló carbamazepint, míg nem neuralgiform fájdalom esetén a szinaptikus monoaminszintet emelő triciklikus antidepresszánsokat (amitriptilin, nortriptilin) választják elsőként. Alternatívaként a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatorna blokkoló pregabalin, gabapentin és a noradrenalin-dopamin visszavételt gátló antidepresszánsok (venlafaxin, duloxetin) jöhetnek még szóba. Újabb lehetőség a virális eredetű neuropátiás fájdalom kezelésében a 8%-os kapszaicin tapasz (Qutenza) (Anand és mtsai., 2011).

Megoldatlan terápiája miatt fontos a patomechanizmus alaposabb megértése és ezáltal új terápiás célpontok feltérképezése. Utóbbiak közé tartozhat a különböző fájdalomállapotokban, így neuropátiában is fontos szerepet játszó TRPA1 receptor (Chen és Hakos, 2015), illetve az endogén agonistáit termelő SSAO.

CÉLKITŰZÉSEK

A fájdalomcsillapítás területén az elmúlt 100 évben nem történt hatásmechanizmusbeli áttörés. A rendelkezésre álló szerek ugyanazon a mechanizmuson alapulnak (COX-gátlás és opioid receptor aktiváció), amelyen az alapvegyületnek számító aszpirin és morfin. A különböző eredetű fájdalomállapotok közül az idegi eredetű (neuropátiás) fájdalom csillapítása jelenti az egyik legnagyobb kihívást a hétköznapi orvosi gyakorlatban. Ennek oka, hogy nagy betegpopulációt érint és a fent említett, jelenleg rendelkezésre álló szerek általában hatástalanok vagy csak átmeneti gyenge hatást eredményeznek, illetve hosszan tartó alkalmazás során súlyos mellékhatásokat okozhatnak. A betegek állandó fájdalomtól szenvednek, ami nemcsak az egyénre, hanem a családra és a társadalomra is jelentős terhet ró. Ezért óriási szükség lenne súlyos mellékhatásoktól mentes, új hatásmechanizmusú, hatékony fájdalomcsillapító szerek kifejlesztésére, amelyek jelentős életminőségbeli javulást eredményezhetnek az érintett betegpopuláció számára. Háttérben traumás idegsérülés (baleset, műtét), ízületi gyulladásos és degeneratív folyamatok (pl. RA, osteoarthritis), illetve különböző daganatok (pl. csont tumorok) állhatnak. Ezek közül ízületi gyulladás és traumás idegsérülés egérmodelljeiben igyekeztünk a fájdalom pontos mechanizmusát és a neuro-immun interakciók szerepét feltárni, új terápiás célpontokat azonosítani, illetve egy új gyógyszerjelölt vegyület hatását és hatásmechanizmusát vizsgálni.

Munkám általános célkitűzései a következők voltak:

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

KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

1. Kísérleti állatok

Kísérleteinkben 20-30 g súlyú, 8-15 hetes hím TRPV1 (TRPV1^{-/-}) és TRPA1 génhiányos (TRPA1^{-/-}) egereket, illetve vad típusú párjaikat (C57BL/6J és TRPA1^{+/+}) használtuk. Az SSAO-gátló vegyületek hatásait azonos korú, 20-30 g súlyú hím C57BL/6J és 30-40 g súlyú hím CD1 egereken vizsgáltuk.

TRPV1^{-/-} egereket intézetünk homozigóta törzsként vette (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, Egyesült Államok) és tenyészt. Mivel az eredeti szülőpárjait C57BL/6J törzsből származó egerekkel visszakeresztették, ezért ezt a törzset használtuk vad típusú (WT) kontrollként. A homozigóta TRPA1^{-/-} és TRPA1^{+/+} egereket a Prof. Pierangelo Geppetti (Firenzei Egyetem, Firenze, Olaszország) által, kollaboráció keretein belül rendelkezésünkre bocsátott heterozigóta TRPA1^{+/-} egerekből származtattuk, majd külön vonalon tenyésztettük őket. Az utódok genotípusát polimeráz láncreakcióval (PCR) határoztuk meg.

Az állatok tenyésztése és tartásuk a vonatkozó standardoknak megfelelően a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar (PTE ÁOK), Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetének állatházában történt. Az állatokat standard méretű (160x137x330 mm) műanyag ketrecekben (5-10 egér/ketrec), 24-25°C-on, 12-12 órás sötét-világos ciklusban tartottuk, a táplálékhoz és az ivóvízhez korlátlanul hozzáfértek.

2. Etikai vonatkozások

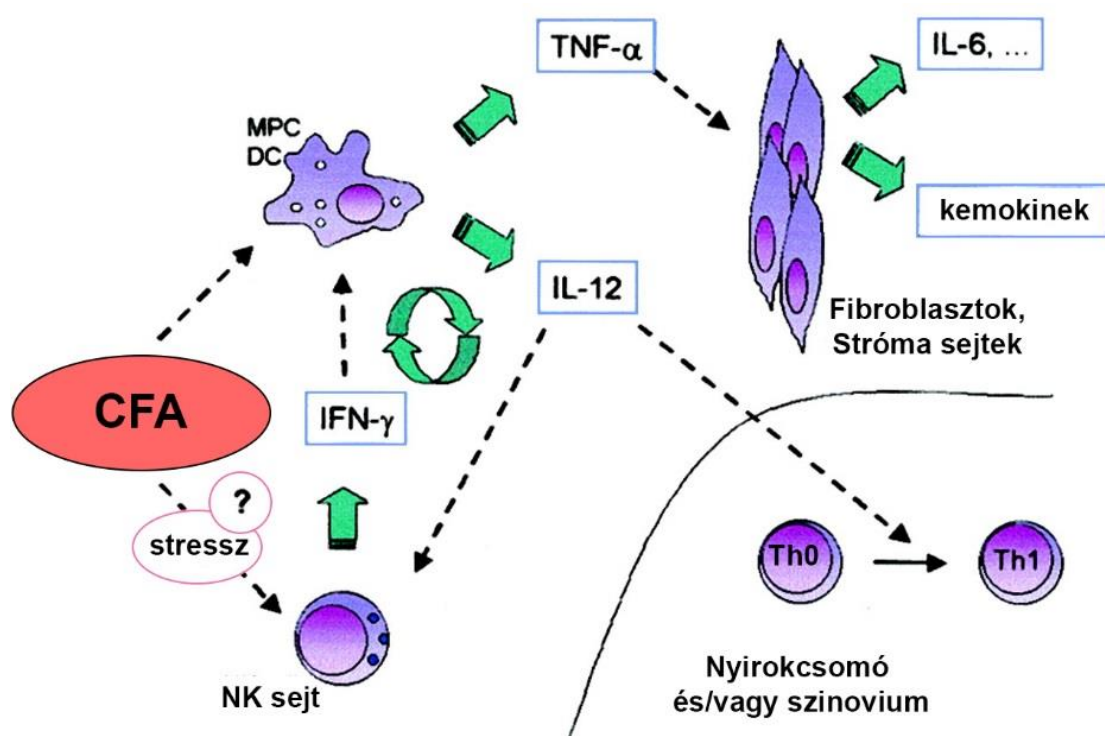
Minden kísérleti eljárás és vizsgálat eleget tett az állatok védelméről és kíméletéről szóló 1998. évi XXVIII. törvény és az állatkísérletek végzéséről szóló 40/2013 (II. 14.) számú kormányrendelet előírásainak, illetve az Európai Parlament és Tanács 2010/63/EU irányelvének és Nemzetközi Fájdalom Társaság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

3. Kísérleti modellek

3.1. CFA-indukált krónikus artritisz modell

A krónikus ízületi gyulladást CD1 egerekben 20-20, TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} egerekben 50-50 µl komplett Freund adjuváns (CFA, 1 mg/ml hővel előlt Mycobacterium

tuberculosis paraffinolajos szuszpenziója) jobb talpba és faroktőbe való szubkután (s.c.) injekciójával váltottuk ki. A szisztémás hatás fokozása érdekében a faroktőbe adást következő napon megismételtük, ezt tekintettük a kísérlet 1. napjának (Szabó és mtsai., 2005). CFA-val a szervezet immunválasz-készsége stimulálható, a baktérium sejtfalában található muramil-dipeptid makrofág és dendritikus sejt aktivációt előidézve IL-12, IL-6, TNF α és IFN γ fokozott termeléséhez vezet. Az említett citokinek hatására a poliklonális T limfociták T helper1 (Th1, CD4+) irányba differenciálódnak és limfokinetet termelnek. CFA alkalmazásának helyén a makrofágok fokozott antigén-feldolgozása sajtos granulóma képződést, míg a CD4+ T sejt aktiváció RA-hoz hasonló krónikus, destruktív artritist eredményez (Joe és Wilder, 1999; Billiau és Matthys, 2001) (**6. ábra**). Az általunk alkalmazott kísérleti paradigma egerekben a CFA-adás oldalán okoz súlyosabb ízületi gyulladást, amelyet a korai fázisban átmeneti, enyhe szisztémás tünetek kísérnek, mint pl. testsúly csökkenés, láz és spontán motilitás csökkenés. Mivel az ellenoldalon nem figyelhetők meg artritises tünetek, ezért az ellenoldali láb szolgált kontrollként.



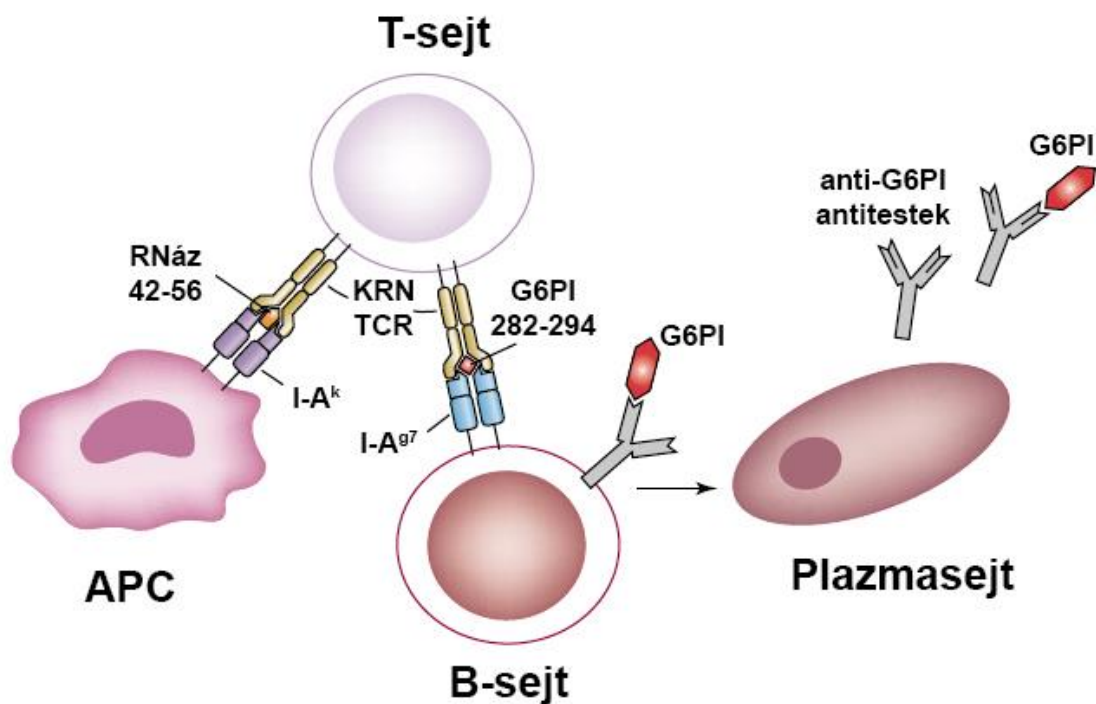
6. ábra CFA-indukált artritisz modell molekuláris mechanizmusa. Rövidítések: CFA: komplett Freund adjuváns, DC: dendritikus sejt, IFN γ : interferon γ , IL: interleukin, MPC: mononukleáris fagocita sejt, NK sejt: természetes ölüsejt, Th: T-helper sejt, TNF- α : tumor nekrosis faktor- α . Forrás: Billiau és Matthys, J Leukoc Biol, 2001.

A 21 napos kísérleti periódus során mechanonociceptív küszöb, lábtérfogat, termonociceptív küszöb, hidegérzékenység, plazmafehérje extravazáció és neutrofil

mieloperoxidáz (MPO) aktivitás meghatározása történt. A kísérleteket három különböző időpontban termináltuk. A kísérlet 4. napján CD1 egerektől mély nátrium-pentobarbitál (Euthanimal, 100 mg/kg intraperitoneálisan (i.p.)) altatásban citokin koncentráció meghatározása céljából szív punkcióval vérmintát vettünk, illetve a tibiotarzális ízületeiket kimetszettük. Nátrium-pentobarbitállal (Euthanimal 100 mg/kg i.p.) való túlaltatást követően 10. napon TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-}, 21. napon CD1 egerek tibiotarzális ízületeit szövettani feldolgozás céljából távolítottuk el.

3.2. K/BxN szérumsztransfer artritisz modell

A sokízületi gyulladást CD1 egerekben artritogén K/BxN szérumsztransferi (300 µl 0. nap), C57BL/6J, TRPV1^{-/-}, TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} egerekben ismételt (150-150 µl 0. és 3. nap) i.p. adásával váltottuk ki (Jakus és mtsai., 2009; Borbély és mtsai., 2015). A kontroll állatok nem-artritogén BxN szérumsztransfer kaptak ugyanezt a paradigmát követve. A szérumsztransferokat Prof. Dr. Mócsai Attila (Semmelweis Egyetem (SE) ÁOK, Élettani Intézet, Budapest, Magyarország) bocsátotta rendelkezésünkre kollaboráció keretein belül. A K/BxN-modell RA széles körben használt passzív sztransfer betegségmodellje, számos immunológiai, szövettani és klinikai hasonlóságot mutat a humán betegséggel (Ditzel, 2004). A K/BxN szérumsztransfer a T sejt receptor (TCR) transzgen-pozitív KRN-C57BL/6J és a nem-elhízott diabéteszes (NOD) egértörzs keresztezéséből létrehozott spontán artritiszes K/BxN egerekből, míg a BxN szérumsztransfer a nem-artritiszes alomtestvérekből származik (Kouskoff és mtsai., 1996). A K/BxN egerekben lévő transzgenikus KRN-TCR egy NOD törzsből származó I-A^{g7} II-es típusú major hisztokompatibilitási komplex (MHC) által prezentált ubikviter saját-fehérjét, a glükóz-6-foszfát izomerázt (G6PI) ismeri fel, amelyet B-sejt aktiváció és G6PI-ellenes antitestek termelése követ ízületi gyulladást eredményezve (Matsumoto és mtsai., 1999) **(7. ábra)**.



7. ábra K/BxN-arthritisz molekuláris mechanizmusa. Rövidítések: APC: antigén-prezentáló sejt, G6PI: glükóz-6-foszfát izomeráz, TCR: T-sejt receptor. Forrás: Ditzel, Trends Mol Med, 2004.

G6PI nemcsak a glikolízis és a glükoneogenezis kulcsenzime a citoszólban, hanem extracellulárisan expresszáldva citokin- és növekedési faktor-szerű hatásokkal is rendelkezik (Ditzel, 2004). RA-s betegek szérumában és szinoviális folyadékában is emelkedett G6PI-szintet mértek (Schaller és mtsai., 2006), amely elsősorban a szinoviális kapillárisok endotél sejtjein és a fibroblastokon (Lu és mtsai., 2017), illetve a porcsejtek felszínén expresszáldik (Matsumoto és mtsai., 2002). Fontos szerepet játszik az RA-s ízületben is jellemző neovaszkularizációban az endotél sejt proliferáció és a fibroblastok vaszkuláris endotél növekedési faktor (VEGF)-szekréciójának serkentése révén (Lu és mtsai., 2017). Számos egészséges recipiens egértörzsben az anti-G6PI antitesteket és számos citokint (pl. IL-1 β , TNF α) tartalmazó K/BxN szérum elsősorban neutrofil és hízósejt aktivációt előidézve tranziens poliartritist eredményez (Ditzel, 2004; Bevaart és mtsai., 2010). Nem ismételt adás esetén a gyulladás 10-14 nap alatt lezajlik (Korganow és mtsai., 1999), azonban a humán klinikai állapothoz hasonlóan idegi eredetű mechanizmusoknak köszönhetően a mechanikai hiperalgécia perzisztál, így a betegséget jellemző krónikus fájdalomállapot neuropátiás komponense is vizsgálható (Christianson és mtsai., 2010).

A 14, illetve 21 napos kísérleti periódus során mechanonociceptív küszöböt, lábtérfogatot, arthritisz klinikai súlyosságát, ízületi funkciót, neutrofil MPO aktivitást és

plazmafehérje extravazációt mértünk. A kísérleteket három különböző időpontban termináltuk. A kísérlet 4. napján CD1 egerektől mély nátrium-pentobarbitál (Euthanimal 100 mg/kg i.p.) altatásban citokin koncentráció meghatározása céljából szív punkcióval vérmintát vettünk, illetve a tibiotarzális ízületeket kimetszettük. A 14 napos kísérlet végén az állatokat nátrium-pentobarbitállal (Euthanimal 100 mg/kg i.p.) túlaltattuk. A 21. napon C57BL/6J egereket mély nátrium-pentobarbitál (Euthanimal 100 mg/kg ip.) altatásban transzkardiálisan 4%-os paraformadehid oldattal perfundáltuk, majd a gerincvelőt és az agyat immunhisztokémiai vizsgálat céljából eltávolítottuk.

3.3. Traumás mononeuropátia modell



8. ábra A nervus ischiadicus részleges leköttése (Seltzer műtét)

Az idegkárosodást nervus ischiadicus 1/3-ának részleges leköttésével váltottuk ki (Seltzer műtét) ketamin/xylazin altatásban (Calypsol/Sedaxylan, 100/5 mg/kg i.p.) C57BL/6J, TRPV1^{-/-}, TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} egerekben. A műtét során a comb felső részén egy kb. 1 cm hosszú bőrmetszést ejtettünk, majd az ideget az izomrostok kíméletes, tompa disszekcióját követően feltártuk, 1/3 részét óvatosan elválasztottuk és atraumatikus szilikonos varróanyaggal (Ethicone 10-0) szorosan leköttöttük, végül a sebet zártuk (Seltzer és mtsai., 1990; Malmberg és Basbaum, 1998) **(8. ábra)**. Kontrollként az ellenoldali intakt láb szolgált.

Mivel irodalmi adatok és kutatócsoportunk korábbi eredményei alapján is szignifikáns mechanikai hiperalgécia posztoperatív 7. napon detektálható, ezért a mechanikai fájdalomküszöb mérést ezen a napon végeztük (Bölcskei és mtsai., 2005). Azokat az egyedeket, amelyeknél 7. napra 20%-nál kisebb mértékű hiperalgécia alakult ki, kizártuk a vizsgálatból. A kísérlet végén (7. nap) az állatokat mély nátrium-pentobarbitál (Euthanimal, 100 mg/kg i.p.) altatásban transzkardiálisan 4%-os paraformaldehid oldattal perfundáltuk, majd a gerincvelőt és az agyat immunhisztokémiai vizsgálat céljából eltávolítottuk.

3.4. Karragenin-indukált akut gyulladás modell

Az akut gyulladást 50 µl 3%-os karragenin-oldat intraplantáris (i.pl.) adásával váltottuk ki TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} egerekben. A kontrollként szolgáló ellenoldali talpba karrageninnel megegyező volumenű 0,9%-os fiziológias sóoldatot injektáltunk (Bölcskei és mtsai., 2005). A karragenin egy tengeri hínárból (a vörösmoszatok törzsébe tartozó

Chondrus crispus) előállított lineáris szulfatált poliszacharid, amely intraplantárisan vagy intraartikulárisan injektálva lokális, kevert típusú, neurogén és nem-neurogén komponensekből álló gyulladásos reakciót idéz elő (Vinegar és mtsai., 1987; Gilligan és mtsai., 1994, Morris, 2003; Posadas és mtsai., 2004; Cunha és mtsai., 2008). Bár a pontos mediátor háttér és mechanizmus nem ismert, a prosztaglandinok egyértelműen kulcsszerepet játszanak a gyulladás és a jól definiálható gyulladásos hiperalgémia kialakulásában. A modellt eredetileg COX-gátlók tesztelésére fejlesztették ki (Winter és mtsai., 1962), azonban széles körben alkalmazzák azokkal összehasonlítva egyéb gyulladáscsökkentő gyógyszerjelölt vegyületek tesztelésére is (O'Rourke és mtsai., 2008; Tábi és mtsai., 2013; Gouda és mtsai., 2016; Shakyá és mtsai., 2016).

A 24 órás kísérleti periódus során mechanonociceptív küszöb, lábtérfogat, termonociceptív küszöb és hidegérzékenység meghatározása történt. A kísérlet végén az állatokat nátrium-pentobarbitállal (Euthanimal, 100 mg/kg i.p.) túlaltattuk.

3.5. CFA-indukált akut gyulladás modell

Akut ízületi gyulladást 20 µl CFA jobb térdízületbe való injekciójával váltottuk ki TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} egerekben, a kontrollként szolgáló bal térdízületbe CFA-val megegyező volumenű 0,9%-os fiziológias sóoldatot injektáltunk (Fernandes és mtsai., 2011). Az injekció beadása ketamin/xylazin (Calypsol/Sedaxylan, 100/5 mg/kg i.p.) altatásban történt. A karrageenin modellel szemben, e modellben a makrofágok antigénprezentáló aktivitása és a neutrofil aktiváció játszik döntő szerepet. A 21 napos, szisztémás reakciót is előidéző kezelési paradigmával ellentétben, 24 óra alatt duzzadás és gyulladásos hiperalgémia alakul ki, de a krónikus fázisban szerepet játszó T-sejt válasszal még nem kell számolnunk.

A 24 órás kísérleti periódus során mechanonociceptív küszöb és térdátmérő meghatározása történt. A kísérlet végén az állatokat nátrium-pentobarbitállal (Euthanimal, 100 mg/kg i.p.) túlaltattuk.

3.6. Akut kemonocifenzív modellek

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

A kapszaicin-érzékeny érző idegvégződések direkt aktivációját az ultrapotens, szelektív TRPV1 agonista reziniferatoxin (RTX) jobb talpba való injektálásával váltottuk ki C57BL/6J egerekben, amely akut neurogén gyulladást eredményezett jelentős termo- és mechanonociceptív küszöb csökkenéssel. Az RTX egyszeri i.pl. injekciója (20 µl, 0,03 µg/ml) 10 perccel az első mérést megelőzően történt. 10 perc után 20 percen keresztül 5

perces időkülönbséggel termonociceptív küszöböt, 2, 4, 6 és 24 óránál pedig mechanonociceptív küszöböt detektáltunk (Almási és mtsai., 2003).

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

A TRPA1-et is expresszáló érző idegvégződésnek direkt aktivációját TRPA1 agonista formalin (20 μ l, 2,5%) jobb talpba való injekciójával váltottuk ki C57BL/6J egerekben, ami szomatikus nocifenzív reakciót és mechanikai fájdalomküszöb csökkenést eredményezett (Bölcskei és mtsai., 2005). Formalin-adást követően az elhárító reakció időtartamát 2 fázisban mértük, 0-5 perc között a formalin direkt kemonociceptív hatását, míg 20-45 perc között a formalin-indukált gyulladásos reakciót detektáltuk. 2 és 4 óránál mechanonociceptív küszöb mérés történt.

4. Farmakológiai módszerek

4.1. SzV-1287 és LJP-1207 kezelés

Az SzV-127 és a referencia SSAO-gátló vegyület, LJP-1207 hatását CFA-indukált artritisz, K/BxN szérumsztransfer artritisz, traumás mononeuropátia és akut neurogén gyulladás modellekben vizsgáltuk. A vegyületek szintézise az SE Szerves Vegytani Intézetében, a korábban leírtak szerint történt (Salter-Cid és mtsai., 2005; Mátyus és mtsai., 2010). LJP-1207-et desztillált vízben, SzV-1287-et kezdetben 2% Tween 80-at (polietilén-glikol-szorbitán-monooleát), 2% etanolt és 96% desztillált vizet tartalmazó oldószerben oldottuk. A későbbiek során az oldási protokollt tökéletesítettük, és az SzV-1287-et 20% Kolliphor HS 15 (polietilén-glikol-15-hidroxiszteráát) és 80% desztillált vizet tartalmazó vivőanyagban alkalmaztuk. Kontrollként minden esetben a megfelelő oldószerrel kezelt állatok szolgáltak.

A 2 mg/ml koncentrációjú oldatokat minden alkalommal frissen, közvetlenül a beadás előtt készítettük. CFA-indukált és K/BxN szérumsztransfer artritisz modellben a vegyületeket naponta i.p. alkalmaztuk 20 mg/kg dózisban, amelyet egy korábban publikált karragenin-indukált akut gyulladás modellben történő vizsgálat alapján választottuk (Tábi és mtsai., 2013). Az SSAO-gátló kezelést CFA- és szérumszadás, illetve a napi első funkcionális mérés (mechanonociceptív küszöb- vagy lábtérfogat mérés) vagy az *in vivo* képalkotó tesztek előtt 20 perccel alkalmaztuk. A kezelések és a mérések 5 perces időkülönbséggel történtek, kivéve az *in vivo* képalkotás előtt, amikor két állatot egyszerre kezeltünk 20 perces időkülönbséggel, mivel ebben az esetben egy mérés időtartama 20 perc és egy időben két állatot tudunk a készülékbe helyezni. Traumás

mononeuropátia modellben a SzV-1287-et egyszeri 20 perces előkezelésként i.p. 2, 5, 10 és 20 mg/kg dózisban, tartós előkezelésként i.p. 20 mg/kg dózisban, LJP-1207-et egyszeri 20 perces előkezelésként 20 mg/kg dózisban alkalmaztuk. Akut neurogén gyulladás modellekben a vegyületeket az RTX- és formalin injekció előtt 20 perccel alkalmaztuk i.p. 20 mg/kg-os dózisban.

4.2. Oxaprozin és diklofenák kezelés

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

5. Vizsgálati módszerek

5.1. Mechanonociceptív küszöbmérés



9. ábra Dinamikus plantáris eszteziométer (DPA)

A mechanonociceptív küszöböt a hátsó lábakon dinamikus plantáris eszteziométerrel (DPA, Ugo Basile 37400, Comerio, Olaszország) határoztuk meg (**9. ábra**). Az egereket egy alul rácsos 15x15 cm méretű plexi ketrecekbe helyeztük, amiben szabadon mozoghattak. Az állatok már 20 perccel a mérések előtt a ketrecekbe kerültek, hogy alkalmazkodjanak a kísérleti körülményekhez. A mérések során egy tompa végű tű segítségével fokozatosan növekvő erővel nyomást gyakoroltunk az állatok hátsó talpára. A maximális erőhatást 10 grammal, az erőhatás növekedési sebességét 4 g/s-ban határoztuk meg. Amikor az állatok fájdalmat éreztek, lábukat elrántották, a számláló leállítását követően pedig a digitális kijelzőről leolvashattuk a mechanonociceptív küszöbnek megfelelő erőhatás mértékét grammal kifejezve. Mindkét lábon 3-3 értéket mértünk, majd ezek átlagaival végeztük a további analízist. A fájdalomküszöb csökkenés (hiperalgészia) mértékét a kísérlet előtt mért kontrollértékekhez viszonyítva, százalékban adtuk meg (Szabó és mtsai., 2005).

5.2. Lábtérfogat mérés



10. ábra Pletizmométer

A lábtérfogat mérését pletizmométerrel végeztük (Ugo Basile Plethysmometer 7140, Comerio, Olaszország) (**10. ábra**). A műszer a közlekedőedények elve alapján működik, két folyadékkal telt henger tartozik hozzá. Az állat hátsó lábát egy előre meghatározott jelig az egyik hengerbe merítettük, az így kiszorított folyadék térfogatot pedig a másikban lévő transzducer érzékelte, amit cm^3 -ben a digitális kijelzőről leolvashattunk. A lábtérfogat változás mértékét a kísérlet előtt mért kontrollértékekhez viszonyítva, százalékban adtuk meg (Szabó és mtsai., 2005).

5.3. Térdátmérő mérés



11. ábra Digitális mikrométer

A térdék anteroposzterior és mediolaterális átmérőit digitális mikrométerrel (Mitutoyo Corporation, Kawasaki, Japán) határoztuk meg (**11. ábra**). Az állatok térdét a műszer két karja közé helyeztük, majd a térdátmérőt egy lapos végű, rugós tengely segítségével lemértük és mm-ben leolvashattuk a digitális kijelzőről. A térdátmérő változás mértékét a

kísérlet előtt mért kontrollértékekhez viszonyítva, százalékban adtuk meg (Helyes és mtsai., 2010).

5.4. Termonociceptív küszöbmérés



12. ábra Emelkedő hőmérsékletű forró lap

A termonociceptív küszöböt a hátsó lábon emelkedő hőmérsékletű forró lappal (IITC Life Science Woodland Hills, CA, Egyesült Államok) határoztuk meg (**12. ábra**). A készülék legfontosabb része egy fémlap (10x20 cm), amihez egy mikroprocesszor által vezérelt fűtőkészülék és egy műanyag megfigyelő kamra tartozik. Az egereket egyenként a fémlapra helyeztük, majd 30°C -ról melegíteni kezdtük $12^\circ\text{C}/\text{min}$ sebességgel. Ha az állat elhárító reakciót mutatott (nyalni, rázni, emelgetni kezdte a lábát) vagy elértük a maximális hőmérsékletet (53°C , amely még biztosan nem okoz szöveti károsodást), a mérést leállítottuk, az állatokat pedig azonnal eltávolítottuk a fémlapról. A mérés megszakítása

után a termonociceptív küszöbnek megfelelő hőmérsékletet °C-ban leolvashattuk a készülék kijelzőjéről, majd a lap hőmérsékletét visszaállítottuk a kiindulási hőmérsékletre. A hiperalgéria mértékét a kísérlet előtt mért kontrollértékekhez viszonyítva, °C-ban adtuk meg (Almási és mtsai., 2003).

5.5. Hidegérzékenység meghatározása



13. ábra Hidegérzékenység vizsgálata

A hidegérzékenységet a hátsó lábak 0°C-os jeges vízfürdőbe merítését követően az elhárító reakció latenciaidejének mérésével határoztuk meg (**13. ábra**). Az elhárító reakció latenciáját a kísérlet előtt mért kontrollértékekhez viszonyítva, másodpercben adtuk meg (Tékus és mtsai., 2014).

5.6. Ízületi gyulladás súlyosságának meghatározása

Az ízületi gyulladás súlyosságát K/BxN szérum-transzfer artritisz modellben szemikvantitatív pontozással határoztuk meg (Jakus és mtsai., 2009). 2 héten keresztül naponta mind a négy végtagot szemikvantitatívan pontoztuk egy 0-tól 10-ig tartó skála segítségével a klasszikus gyulladásos tünetek, elsősorban az ödéma és hiperémia mértéke alapján (0-1,5: egészséges, 1,5-2,5: minimális betegségre utaló tünetek, 2,5-4: enyhe gyulladás, 4-7: közepes gyulladás, 7-10: súlyos gyulladás). A további analízist a négy érték átlagával végeztük. A gyulladás szemikvantitatív analízise nemcsak kiváló kiegészítő módszere a lábtérfogat mérésnek, hanem mivel egyszerűen és gyorsan kivitelezhető, a komplex funkcionális és képalkotó tesztek megfelelő időpontjának kiválasztására is használható.

5.7. Ízületi funkció megítélése



14. ábra Grid teszt

Az állatok ízületi funkcióját jelző kapaszkodási képességet 2 héten keresztül naponta ún. grid tesztrel határoztuk meg K/BxN szérum-transzfer artritisz modellben. Az állatokat egy vízszintes rácstra helyeztük, majd egy vastag vattaréteg felett megfordítottuk és 20 másodperces maximális idővel a rácson töltött időt detektáltuk (14. ábra).

A vizsgálat során mért eredményeket a kísérlet előtt mért kontrollértékekkel összehasonlítva meghatározhattuk az ízületi funkcióromlás mértékét (Jakus és mtsai., 2009).

5.8. *In vivo* neutrofil mieloperoxidáz aktivitás mérés



15. ábra IVIS Lumina II
készülék

Az artritisz patomechanizmusában fontos szerepet betöltő neutrofil MPO aktivitását lumineszcens *in vivo* képalkotással, IVIS Lumina II (PerkinElmer, Waltham, Egyesült Államok) készülék segítségével vizsgáltuk (15. ábra). Kontrasztanyagként a neutrofil MPO aktivitással *in vivo* jól korreláló reaktív oxigén gyökökre (ROS) specifikus kemilumineszcens vegyületet, luminolt (5-amino-2,3-dihydro-1,4-ftálazidindion) használtunk (Gross és mtsai., 2009). Az állatokat ketamin/xylazinnal (Calypsol/Sedaxylan, 100/5 mg/kg i.p.) elaltattuk, majd a foszfát pufferes sóoldatban (PBS) oldott nátrium-luminolt (20 mg/ml) i.p. alkalmaztuk 150 mg/kg dózisban. A biolumineszcencia mértékét luminol beadását követően 10 perccel mértük. Living Image® szoftver (PerkinElmer, Waltham, Egyesült Államok) segítségével a tibiotarzális ízületek felett kijelölt területeken (Regions of Interest, ROI) a lumineszcencia mértékét teljes sugárzásként adtuk meg (total radiance, total photon flux/s) (Botz és mtsai., 2014).

5.9. *In vivo* plazmafehérje extravazáció mérés

A plazmafehérje extravazáció mértékét fluoreszcens *in vivo* képalkotással, IVIS Lumina II (PerkinElmer, Waltham, Egyesült Államok) készülék segítségével határoztuk meg (15. ábra). Kontrasztanyagként a vaszkuláris permeabilitás fokozódás esetén a gyulladáso

használtunk (Meier és mtsai., 2010; Botz és mtsai., 2015). Az állatokat ketamin/xylazinnal (Calypsol/Sedxylan, 100/5 mg/kg i.p.) elaltattuk, majd a Kolliphor HS 15 5 w/v%-os vizes oldatában oldott fluorofórt intravénásan (i.v.) alkalmaztuk CD1 egerek esetén 0,35 mg/kg, C57BL/6J alapú törzsek esetén 0,5 mg/kg dózisban. A fluoreszcencia mértékét a fluorofór beadását követően 20 perccel mértük. Living Image® szoftver (PerkinElmer, Waltham, Egyesült Államok) segítségével a tibiotarzális ízületek felett kijelölt területeken (Regions of Interest, ROI) a fluoreszcencia mértékét teljes sugárzó hatékonyságként adtuk meg (total radiant efficiency, [photons/s/cm²/sr]/[μW/cm²]) (Botz és mtsai., 2014).

5.10. Szövettani vizsgálat

CFA-indukált artritisz modellben nátrium-pentobarbitállal (Euthanimal 100 mg/kg i.p.) történő túlaltatást követően 10. napon TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-}, 21. napon CD1 egerek tibiotarzális ízületeit távolítottuk el szövettani feldolgozás céljából. A kimetszett ízületeket 8 órán keresztül 4%-os pufferelt formalinban fixáltuk, majd ugyanennyi ideig 4°C-on dekalcináltuk 7 w/v% AlCl₃-ot, 5 v/v% hangyasavat és 8,5 v/v% sósavat tartalmazó oldat segítségével. A felpuhult mintákat Sörensen-féle foszfát-pufferben 8 órán keresztül mostuk, majd 8-8 óráig 4°C-on 5, 10 és 15 w/v%-os szacharóz oldatban dehidratáltuk, végül paraffinba ágyasztuk, mikrotómmal 3-5 μm-es szeletekre vágtuk és hematoxilin-eozinnal megfestettük.

A metszeteket a kísérletektől független kolléganőm, Dr. Borbély Éva értékelte előre meghatározott paraméterek, 1) a szinovium mononukleáris sejt infiltrációja, 2) a szinoviális sejtréteg hiperpláziája, 3) a porcdestrukció és 4) a csonterózió mértéke alapján. A pontozás minden paraméter esetén egy 0-3-ig terjedő skálán történt, 0 ponttal a legenyhébb, 3 ponttal a legsúlyosabb elváltozásokat értékeltük. Az értékelés végén a pontszámokat összeadtuk, így az egyes metszetekhez, és ezáltal az egyes állatcsoportokhoz tartozó összetett artritisz pontszámot kaptuk meg (Szabó és mtsai., 2005).

5.11. Gyulladásos citokin koncentráció meghatározása

CFA-indukált és K/BxN szérum-transzfer artritisz modellben mély nátrium-pentobarbitál (Euthanimal, 100 mg/kg i.p.) altatásban a 4. napon CD1 egerektől szív punkcióval vérmintát vettünk, illetve a tibiotarzális ízületeiket kimetszettük citokin koncentráció meghatározása céljából. A vérmintákat 40 μl etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA) (50 mg/ml, pH 7,5) és 20 μl aprotinint (Gordox, 10000 KIU/ml) tartalmazó jéghideg

csövekbe helyeztük, majd 5 percig 1000, 10 percig 10000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk. A kimetszett ízületek tömegét lemértük, majd jéghideg, PBS-t és fenilmetán-szulfonil fluorid (PMSF, 10 mg/ml) proteáz inhibitor tartalmazó homogenizáló oldatba tettük és Micra D-9 homogenizátor (Art-moderne Labortechnik, Müllheim, Németország) segítségével homogenizáltuk. A homogenizátumokat 10 percig, 12500 fordulat/perc sebességgel 4°C-on centrifugáltuk. A vérplazmát és a homogenizátumok felülúszóját -80°C-on tároltuk a vizsgálat megkezdéséig (Borbély és mtsai., 2016).

IL-1 β , IL-6, kemokin (C-X-C motívum) ligand 1 (CXCL1), más néven keratinocita kemoattraktáns (KC), kemokin (C-X-C motívum) ligand 2 (CXCL2), más néven makrofág gyulladásos protein-2 (MIP-2) és TNF- α koncentrációját Luminex Multiplex Immunoassay módszerrel határoztuk meg, Milliplex Egér Citokin/Kemokin Mágneses Gyöngy Panel (Merck Millipore, Billerica, MA, Egyesült Államok) felhasználásával. A méréseket megelőző optimalizálásokat követően minden mintát hígítatlanul, vakon, duplikátumban mértünk le. A kísérletet a gyártó leírásának megfelelően végeztük. 25 μ l-t a mintákból, a kontrollból és a standard reagenskből 96-lyukú lemezre pipettáztuk, amely 25 μ l antitesttel bevont, fluoreszcens festékkel színekódolt gyöngyöt tartalmazott. Mosási és inkubációs lépések közbeiktatásával biotinilált szekunder antitestet és streptavidin-PE-t adtunk a mintákhoz. Az utolsó mosást követően 150 μ l köpenyfoliadékot adtunk minden lyukhoz, majd a lemezt inkubáltuk és Luminex 100 készülék segítségével leolvastuk a fluoreszcens intenzitást. Az értékelés során a standard görbét 5 pontos regressziós illesztéssel vettük fel, majd a gyöngyök medián fluoreszcens intenzitását xPotent 3.1 szoftverrel elemeztük (Bánki és mtsai., 2013). Az eredményeket az ízületi homogenizátumok esetén szövetsúlyra vonatkoztatva, pg/mg-ban, a vérplazmák esetén pg/ml-ben fejeztük ki.

5.12. Sejttenyésztés

SzV-1287 és LJP-1207 porcdifferenciációra kifejtett hatását porcosodó „micromass” mezenchimális sejt kultúrán vizsgáltuk debreceni kollaborátoraink, Dr. Zákány Róza és Dr. Juhász Tamás segítségével. A porcosodó mezenchimális sejteket Ross fajtájú fehér húshibrid, Hamburger és Hamilton szerinti 22-24-es fejlődési stádiumban lévő csirkeembriók disztális végtagtelepeiből izoláltuk. A kísérlet 0. napján a 15×10^6 sejt/ml sűrűségű szuszpenzióból 30 μ l-es cseppeket cseppentettünk a 24-lyukú tenyésztőedényekbe (Eppendorf, Hamburg, Németország) helyezett fedőlemezekre (Menzel-Gläser, Menzel GmbH, Braunschweig, Németország). A sejteket 37°C-on, 5% CO₂ és 80% relatív páratartalom mellett termosztáltuk, majd 10% főtális borjúsérummal

(Gibco, Gaithersburg, MD, Egyesült Államok) kiegészített, Ham's F12 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Egyesült Államok) táptalajjal tápláltuk. A tápfolyadékot másnaponta cseréltük. A sejtek 2-3. tenyésztési napon spontán porcsejteké differenciálódtak, a 6. tenyésztési napon pedig már nagy mennyiségű extracelluláris mátrixot tartalmazó porccsomók voltak detektálhatók (Juhász és mtsai., 2014). A sejt kultúrákat 10 napig tartottuk meg, SzV-1287-et és LJP-1207-et 10 μ M-os koncentrációban 6. és 8. naptól kezdve folyamatosan alkalmaztuk. Kontrollként az oldószerrel kezelt sejt kultúrák szolgáltak.

5.13. A porcképződés mértékének fénymikroszkópos detektálása

10. tenyésztési napon a sejt kultúrákat abszolút alkohol és 40% formalin 4:1 arányú keverékével fixáltuk, majd 3% ecetsavban oldott 0,1%-os dimetilmetilénkékkel (DMMK) megfestettük. Ecetsavas mosást követően a mintákat gumiarábikummal fedtük le. A festés következtében vörös metakromáziával festődő porcmátrix válik láthatóvá, amit Nikon Eclipse E800 fénymikroszkóp (Nikon Corporation, Tokió, Japán) és Olympus DP72 kamera segítségével vizualizáltunk.

A metakromáziásan festődő porcmátrix mennyiségének szemikvantitatív értékelése céljából 10. tenyésztési napon DMMK-val nem festett telepeket Khale-fixálóval (28% etanol, 4% formalin, 2% ecetsav) fixáltuk, majd glikokoll/glicin-HCl pufferben (pH 1,8) oldott 0,1%-os toluidinkékkel (TK) megfestettük. A glikokoll/glicin-HCl oldattal történő mosást követően a festéket abszolút alkoholban oldott 8%-os HCl oldattal nyertük vissza. A visszanyert toluidinkék festék abszorbanciáját 625 nm-en microplate leolvasó (Chameleon, Hidex Ltd., Turku, Finnország) segítségével határoztuk meg mindegyik kísérleti csoport 3-3 sejt kultúrájából három egymástól független kísérletben (Matta és mtsai., 2008).

6. Felhasznált anyagok

A formalint (Formaldehydum solutum 37%; Ph.Hg. VII.), a ketamint (Calypsol, Richter Gedeon NyRt., Budapest, Magyarország), a xylazint (Sedaxylan, Eurovet Animal Health B.V., Bladel, Hollandia), a nátrium-pentobarbitált (Euthanimal, Alfasan Nederland B.V., Woegen, Hollandia), az aprotinint (Gordox, Richter Gedeon NyRt., Budapest, Magyarország) és a diklofenákot a PTE Klinikai Központi Gyógyszertárából, az RTX-et, a CFA-t, a karragenint, az ICG-t, a Kolliphor HS 15-öt, a Tween 80-at, a PMSF-et és a DMMK-t a Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Egyesült Államok), a nátrium-luminolt a Gold Biotechnology (Olivette, MO, Egyesült Államok), az IR-676-ot a Spectrum-Info

(Kijev, Ukrajna), az EDTA-t és a toluidinkéket a Reanal (Budapest, Magyarország) cégtől szereztük be. SzV-1287-et, LJP-1207-et és oxaprozint Prof. Mátyus Péter (SE Gyógyszerésztudományi Kar (GYTK), Szerves Vegytani Intézet, Budapest, Magyarország) bocsátotta rendelkezésünkre kollaboráció keretein belül.

7. Statisztikai analízis

Az ábrákon az adatsorok átlagait és azok standard hibáit ($\pm$ S.E.M), a szövettani eredmények esetén a box plot-okat tüntettük fel. A statisztikai analízist GraphPad Prism 5 szoftver segítségével végeztük. A mechanikai hiperalgéria (kivéve a traumás mononeuropátia modellben), a láb- és térd ízületi duzzadás, a termális hiperalgéria, a hidegérzékenység, az artritisz súlyossági pontszáma és az ízületi funkcióvesztés esetén Bonferroni módosított poszttesztel kiegészített két utas variancia analízist (ANOVA), a neuropátiás hiperalgéria, az *in vivo* optikai képalkotás, a citokin koncentráció mérés és a szövettani szemikvantitatív pontszámok esetén Bonferroni módosított poszttesztel kiegészített egy utas ANOVA-t, a formalin-indukált elhárító reakció és a TK-val festett porcmátrix mennyiségének szemikvantitatív értékelése esetén Student-féle kétmintás t-tesztet alkalmaztunk. Az eredmények összehasonlításakor azokat a változásokat tekintettük szignifikánsnak, ahol $p < 0,05$ volt.

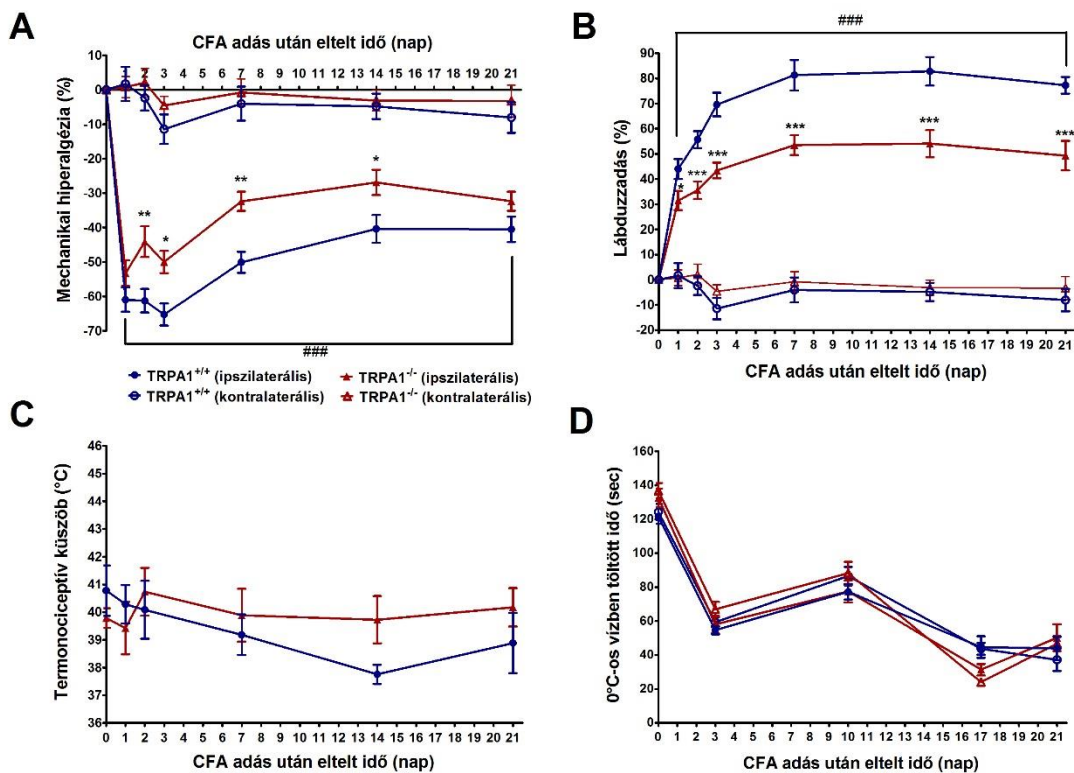
EREDMÉNYEK

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

1.1. Eredmények

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

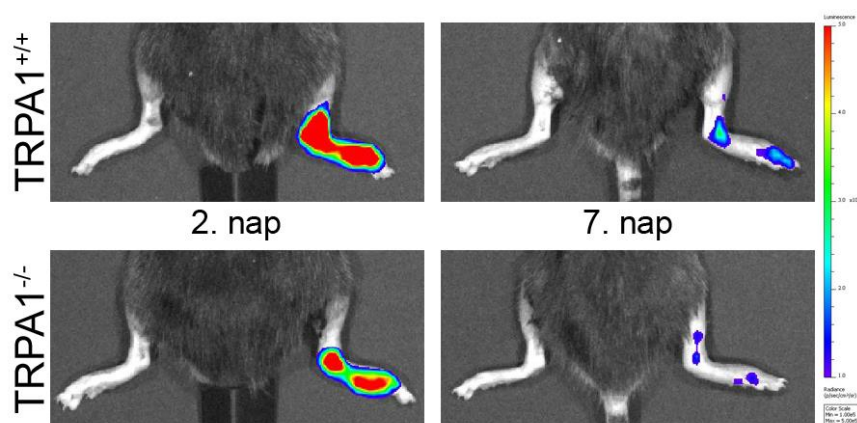
TRPA1^{+/+} egerekben jelentős mechanikai fájdalomküszöb csökkenés és lábduzzadás alakult ki a CFA adást követően, ami 3. (65%) és 14. napra (83%) érte el maximumát. Míg a mechanikai hiperalgémia 40%-ra csökkent a kísérlet végére, addig a lábduzzadás mértéke csak minimálisan csökkent (77%). TRPA1^{-/-} csoportban a mechanikai hiperalgémia a 2., az ödéma már az 1. naptól kezdve szignifikánsan kisebb volt a vad csoporthoz képest (**16.A,B ábra**). CFA hatására nem volt megfigyelhető számottevő termális hiperalgémia egyik csoportban sem, míg a hidegtolerancia mindkét egértörzsben hasonló mértékben csökkent a kísérlet során a gyulladástól függetlenül, ami valószínűleg az ismételt méréseknek köszönhető (**16.C,D ábra**).



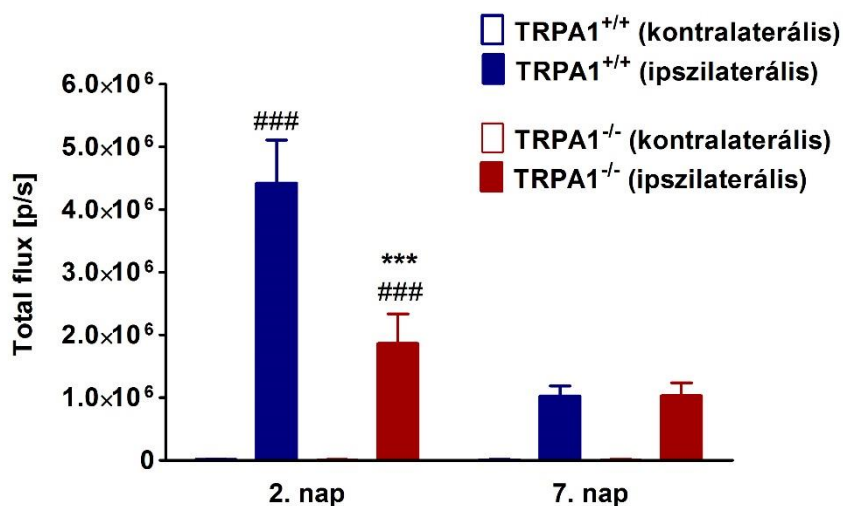
16. ábra CFA-indukált (A) mechanikai hiperalgémia, (B) lábduzzadás, (C) termális hiperalgémia és (D) hidegérzékenység TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} egerekben. N=14-17 egér/csoport, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs. TRPA1^{+/+} ipszilaterális láb, ###p<0,001 vs. kontralaterális láb (Bonferroni módosított poszttesztzel kiegészített 2-utas ANOVA).

1.1.2. CFA-indukált artritisz korai fázisában a neutrofil MPO aktivitás kisebb TRPA1^{-/-} csoportban

CFA-indukált artritisz korai fázisában (2. napon) a neutrofil MPO aktivitást indirekt jelző luminol adását követően a TRPA1^{+/+} és a TRPA1^{-/-} csoportban is jelentős aktivitás fokozódást tapasztaltunk az artritiszes bokaízületekben, azonban ez a TRPA1^{-/-} állatokban szignifikánsan kisebbnek bizonyult. Késői fázisban (7. napon) hasonló mértékű, már csak minimális aktivitás fokozódás volt megfigyelhető mindkét törzsben (17., 18. ábra).



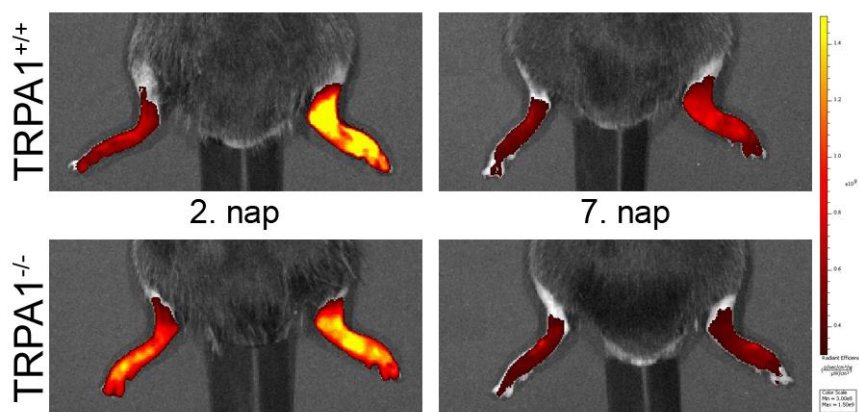
17. ábra TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} egerek CFA-indukált neutrofil MPO aktivitást reprezentáló ábrái.



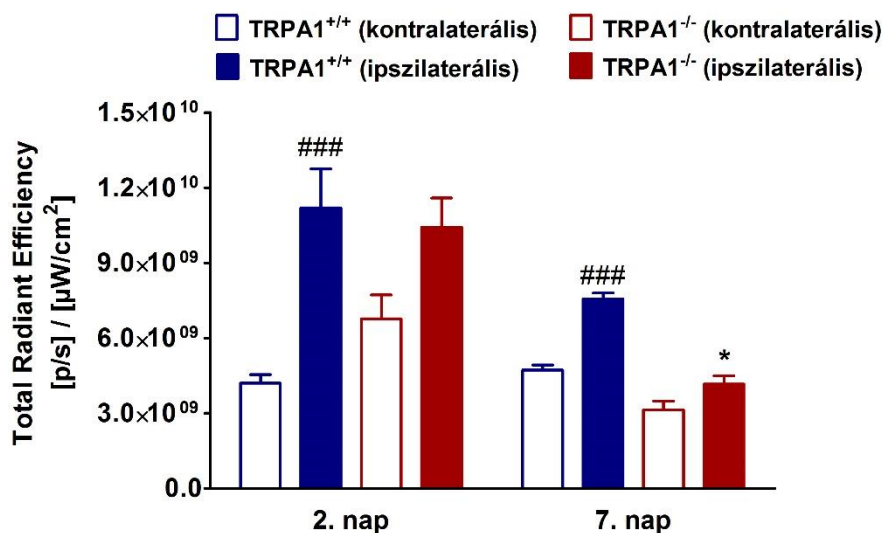
18. ábra CFA-indukált neutrofil MPO aktivitás TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} egerekben. N=5-7 egér/csoport, ***p<0,001 vs. TRPA1^{+/+} ipszilaterális láb, ###p<0,001 vs. kontralaterális láb (Bonferroni módosított poszttesztzel kiegészített 1-utas ANOVA).

1.1.3. CFA-indukált artritisz késői fázisában a plazmafehérje kiáramlás kisebb TRPA1^{-/-} csoportban

A biolumineszcenciához hasonlóan a vaszkuláris permeabilitás fokozódást jelző fluoreszcencia is jelentősen megemelkedett korai fázisban mindkét csoportban, azonban különbséget nem tapasztaltunk közöttük. Ezzel szemben a késői fázisban (7. napon), amikor a plazmafehérje kiáramlás már csökkenő tendenciát mutatott, szignifikáns különbséget detektáltunk a TRPA1^{-/-} egerekben (19., 20. ábra)



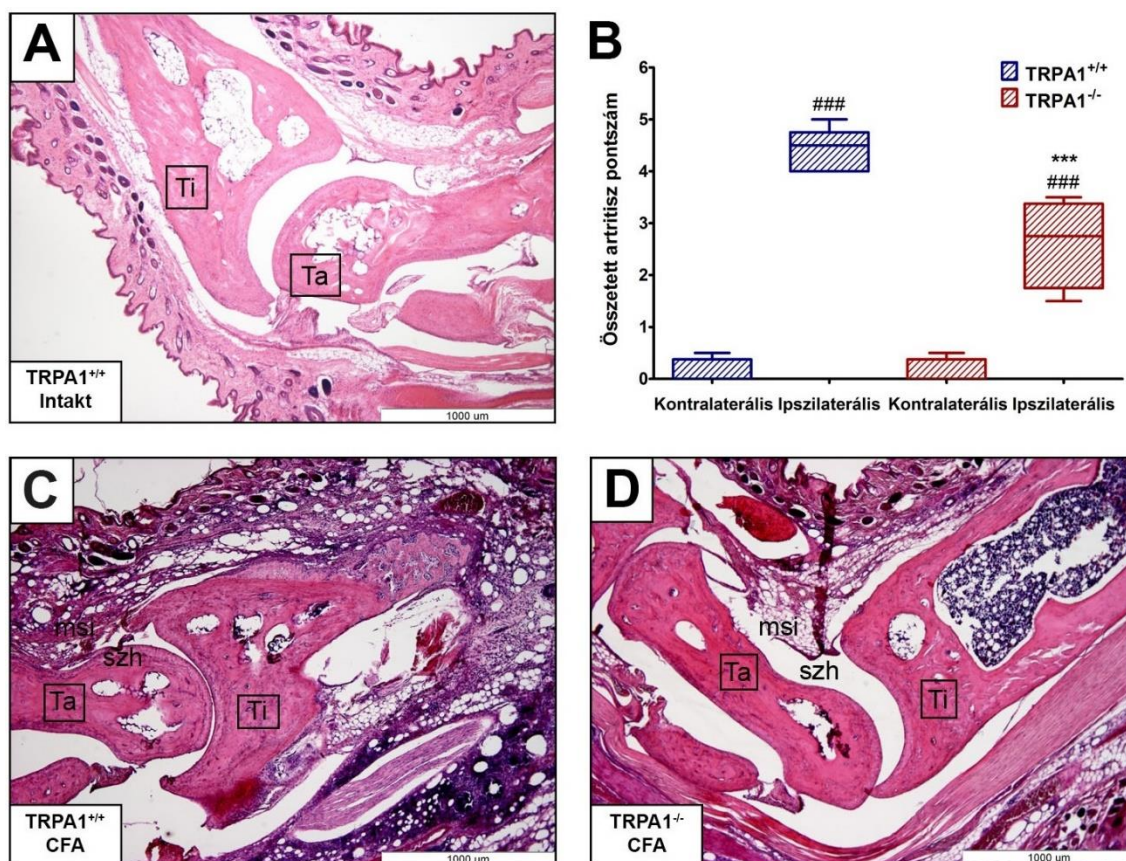
19. ábra TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} egerek CFA-indukált plazmafehérje extravazációt reprezentáló ábrái.



20. ábra CFA-indukált plazmafehérje kiáramlás TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} egerekben. N=5-7 egér/csoport, *p<0,05 vs. TRPA1^{+/+} ipszilaterális láb, ###p<0,001 vs. kontralaterális láb (Bonferroni módosított poszttesztzel kiegészített 1-utas ANOVA).

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

A TRPA1^{+/+} és a TRPA1^{-/-} egerek intakt ízületi mintáiban szövettani eltérést nem találtunk. A CFA adást követő 10. napon, amikor a gyulladás elérte a maximumát, a TRPA1^{+/+} egerek tibiotarzáris ízületeiben jelentős mononukleáris sejt infiltrációt és szinoviális hiperpláziát, illetve minimális porcdestrukciót észleltünk csonterózió nélkül (**21.C ábra**). Ezzel szemben TRPA1^{-/-} egerek esetén a szinoviumban kisebb mértékű gyulladásos sejt infiltrációt és enyhe szinoviális hiperpláziát láttunk, míg porcdestrukció és csonterózió egyáltalán nem fordult elő (**21.D ábra**). Az említett hisztopatológiai paraméterek szemikvantitatív értékelése során a TRPA1^{-/-} csoportban szignifikánsan kisebb összetett artritisz pontszám volt megfigyelhető a TRPA1^{+/+} csoporthoz képest (**21.B ábra**).

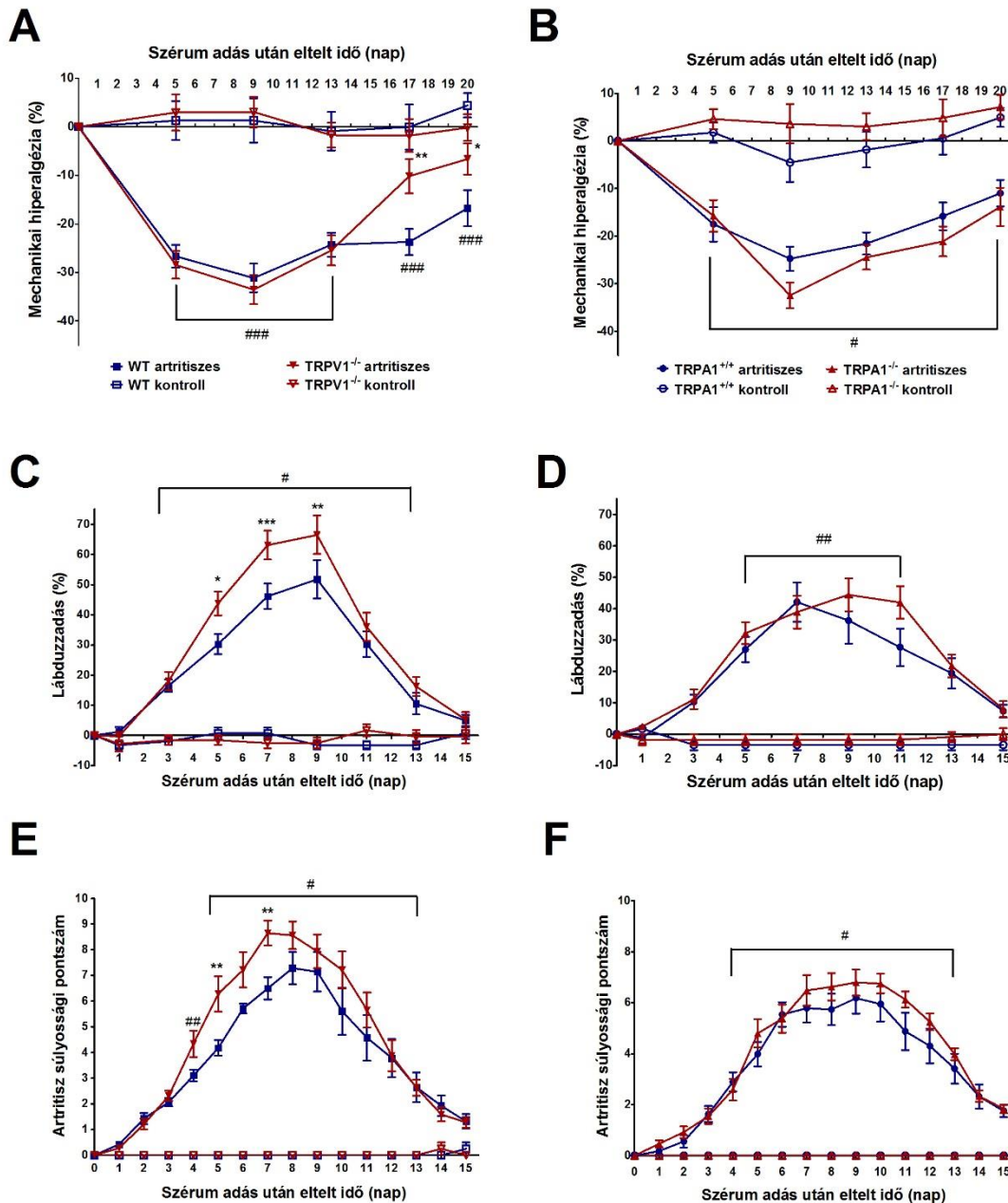


21. ábra (A) Intakt TRPA1^{+/+}, CFA-val kezelt (C) TRPA1^{+/+} és (D) TRPA1^{-/-} egerek tibiotarzáris ízületeinek szövettani metszetei (40x-es nagyítás, HE festés, Ti: tibia, Ta: tarsus, msi: mononukleáris sejt infiltráció, szh: szinoviális hiperplázia). N=4-5 egér/csoport; ***p<0,001 vs. TRPA1^{+/+} ipsilaterális ízület, ###p<0,001 vs. kontralaterális ízület (Bonferroni módosított poszttesztel kiegészített 1-utas ANOVA).

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

WT és TRPA1^{+/+} egerekben is jelentős mechanikai hiperalgémia jött létre az artritogén szérum adását követően, ami 9. npra (25-31%) érte el maximumát, majd 11-17%-ra csökkent a 21 napos kísérlet végére. TRPV1^{-/-} csoportban a mechanonociceptív küszöbértékek a 13. napig hasonló tendenciával változtak, azonban a 17. naptól kezdve a hiperalgémia mértéke szignifikánsan kisebb volt a WT csoporthoz viszonyítva. A TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} csoportot összehasonlítva nem találtunk szignifikáns különbséget e tekintetben **(22.A,B ábra)**.

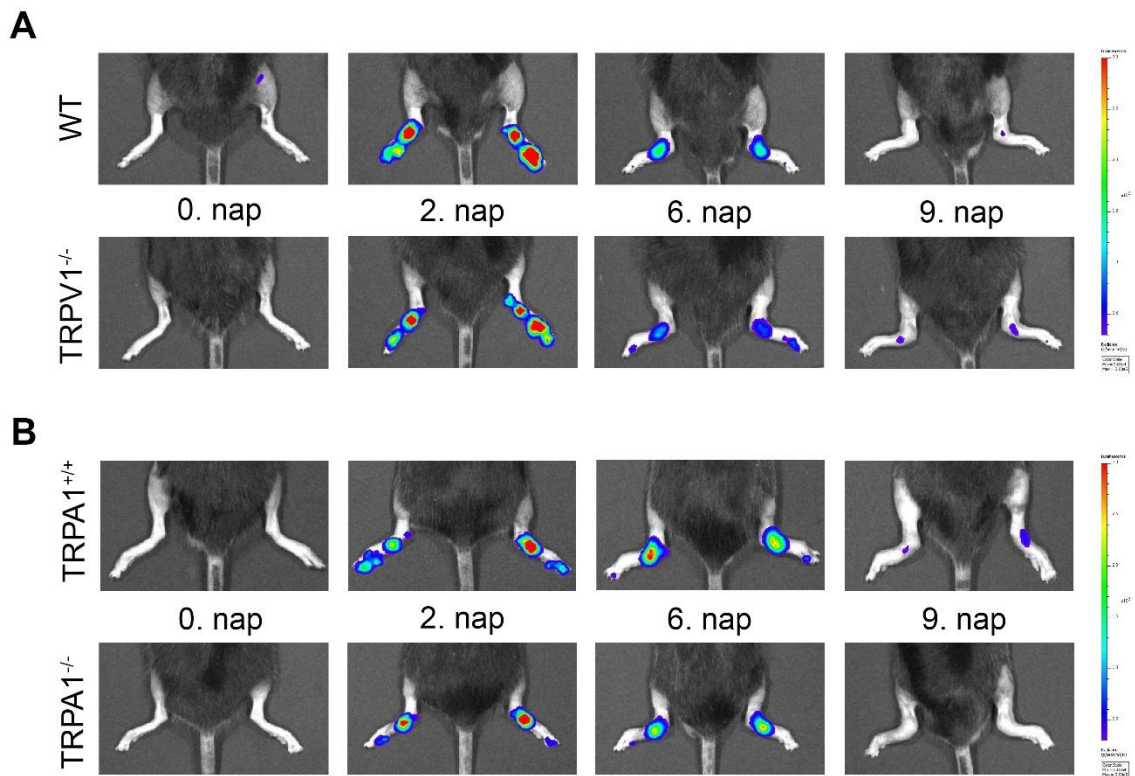
Az aritriszes vad típusú egerekben a lábtérfogat kb. 50%-os növekedést ért el a 7-9. npra, míg a génhiányos egerek esetén mindkét csoportban az ödéma a 9. npra érte el maximumát (44-66%). TRPV1^{-/-} csoportban a lábduzzadás szignifikánsan nagyobbak bizonyult az 5-9. nap között, míg a TRPA1^{-/-} csoportban a vad csoporthoz hasonló mértékű ödéma alakult ki. A 15. npra az ödéma mindegyik aritriszes csoportban teljesen megszűnt **(22.C,D ábra)**. Az aritrisz klinikai súlyossági pontszáma szintén 7-9. napon érte el maximumát az aritriszes vad típusú (WT: 7 pont, TRPA1^{+/+}: 6 pont) és génhiányos csoportokban (TRPV1^{-/-}: 9 pont, TRPA1^{-/-}: 7 pont). A lábtérfogat mérés eredményéhez hasonlóan a pontozásnál is a TRPV1^{-/-} egereknél tapasztaltunk súlyosabb gyulladáshos tüneteket, amely 5. és 7. napon is szignifikánsnak bizonyult. TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} csoport között nem találtunk szignifikáns különbséget **(22.E,F ábra)**.



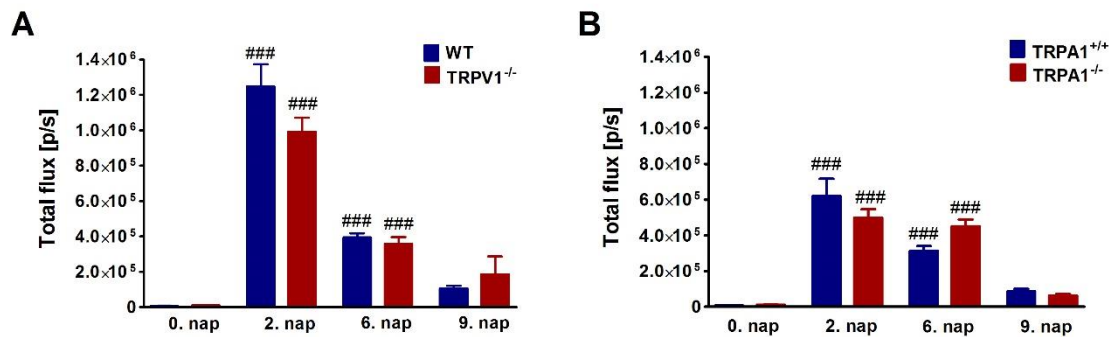
22. ábra K/BxN szérum-indukált mechanikai hiperalgészia, lábduzzadás és artritisz súlyossági pontszám (A,C,E) WT és TRPV1^{-/-}, illetve (B,D,F) TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} egerekben N=4-14 egér/csoport, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs. artritiszes vad típusú csoport, #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 vs. nem artritiszes kontroll csoport (Bonferroni módosított poszttesztzel kiegészített 2-utas ANOVA).

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

A neutrofil granulociták MPO aktivitását indirekt módon jelző biolumineszcencia, amely a szérum adást követő 2. nap érte el a maximumát, hasonló mértékű volt az artritiszes vad típusú, TRPV1^{-/-} és TRPA1^{-/-} egerek bokaízületeiben (23., 24. ábra).



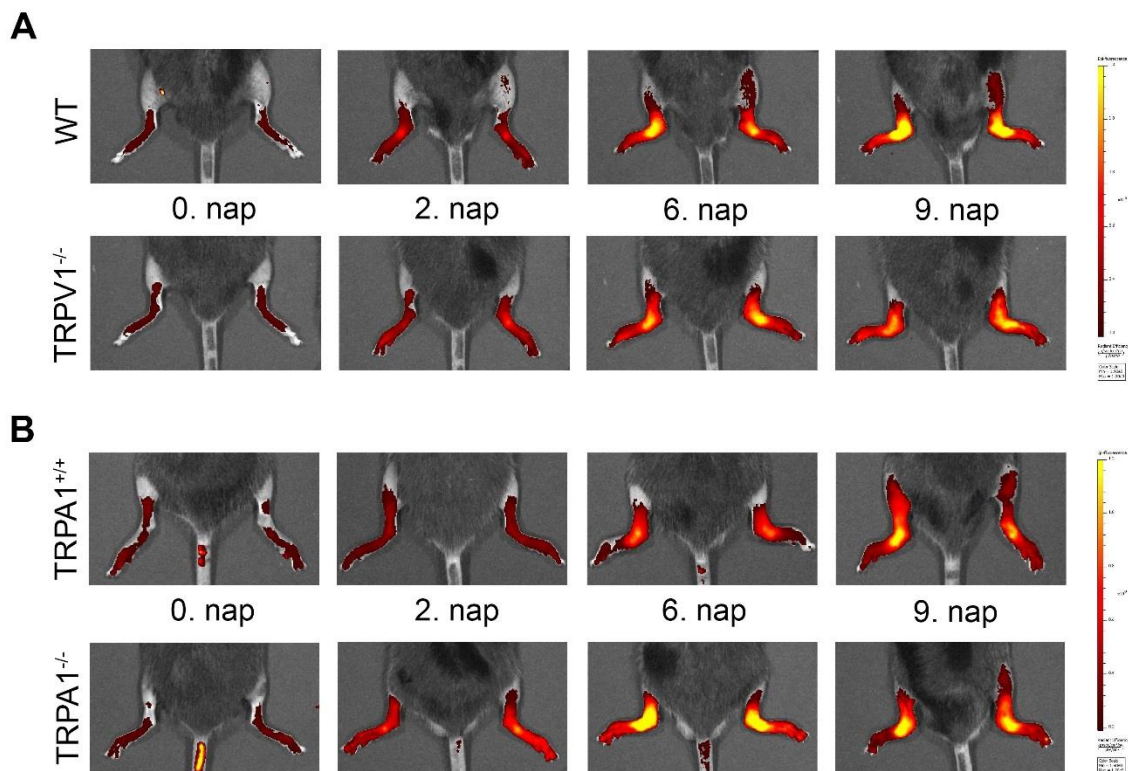
23. ábra (A) WT és TRPV1^{-/-}, illetve (B) TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} egerek KBxN szérum-indukált neutrofil MPO aktivitást reprezentáló ábrái.



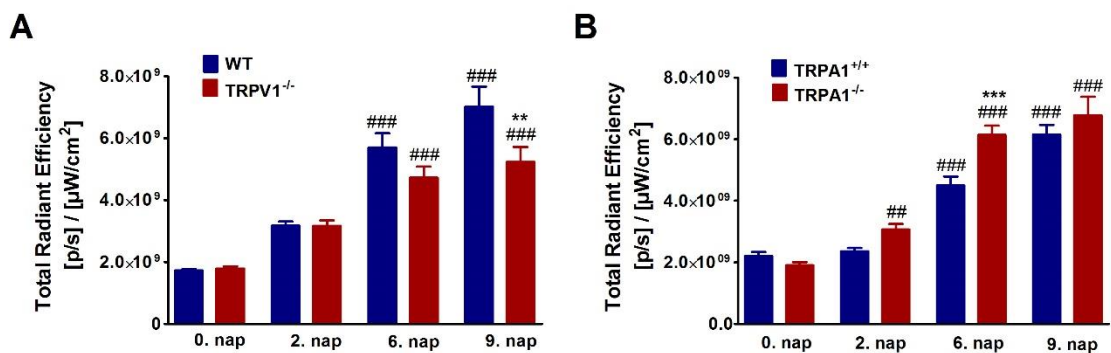
24. ábra K/BxN szérum-indukált neutrofil MPO aktivitás (A) WT és TRPV1^{-/-}, illetve (B) TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} egerekben. N=7-14 egér/csoport, **p<0,01 vs. artritiszes vad típusú csoport, ###p<0,001 vs. saját 0. napi kontroll (Bonferroni módosított poszttesztzel kiegészített 1-utas ANOVA).

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

Artritisz késői fázisában (6. és 9. nap), amikor a boka- és a láb kisízületeiben a vaszkuláris permeabilitás mértéke a legnagyobb, TRPV1^{-/-} csoportban szignifikánsan kisebb, TRPA1^{-/-} csoportban szignifikánsan nagyobb plazmafehérje kiáramlást tapasztaltunk (25., 26. ábra).



25. ábra (A) WT és TRPV1^{-/-}, illetve (B) TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} egerek KBxN szérum-indukált plazmafehérje extravazációt reprezentáló ábrái.

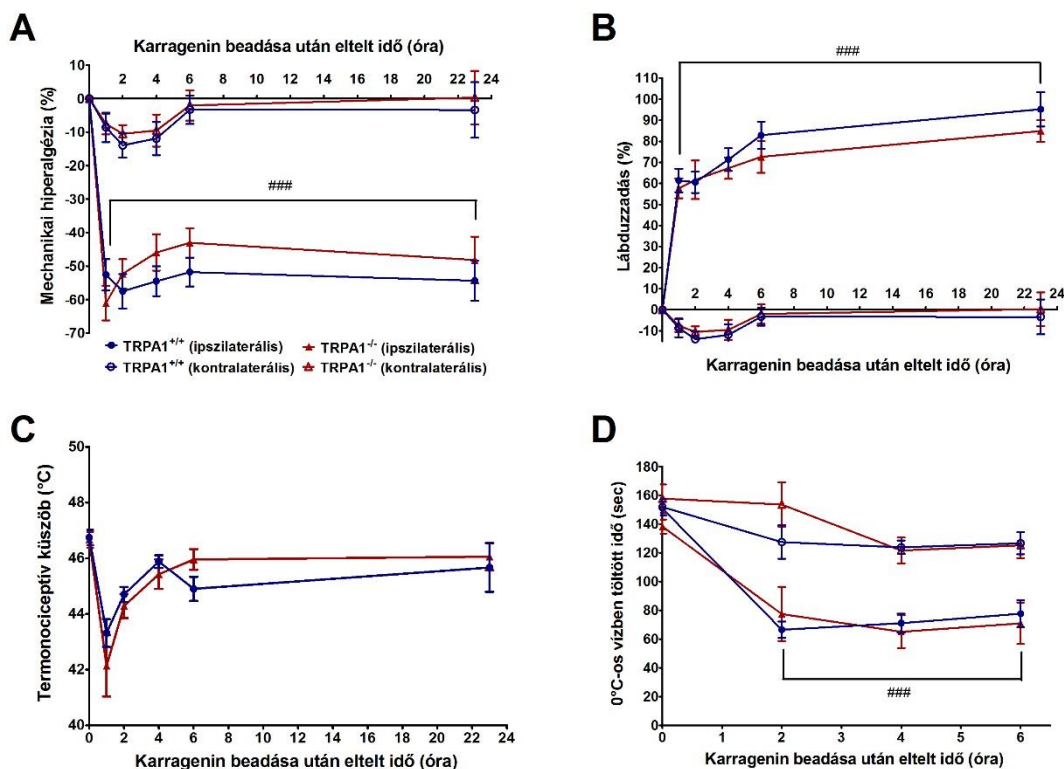


26. ábra K/BxN szérum-indukált plazmafehérje kiáramlás (A) WT és TRPV1^{-/-}, illetve (B) TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} egerekben. N=7-14 egér/csoport, *p<0,01, ***p<0,001 vs. arthritisztes vad típusú csoport, ###p<0,01, ####p<0,001 vs. saját 0. napi kontroll (Bonferroni módosított poszttesztzel kiegészített 1-utas ANOVA).

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

Mind a TRPA1^{+/+}, mind a TRPA1^{-/-} csoportban hasonló mértékű mechanikai fájdalomküszöb csökkenés (52% és 61%) és lábtérfogat növekedés (61% és 58%) alakult

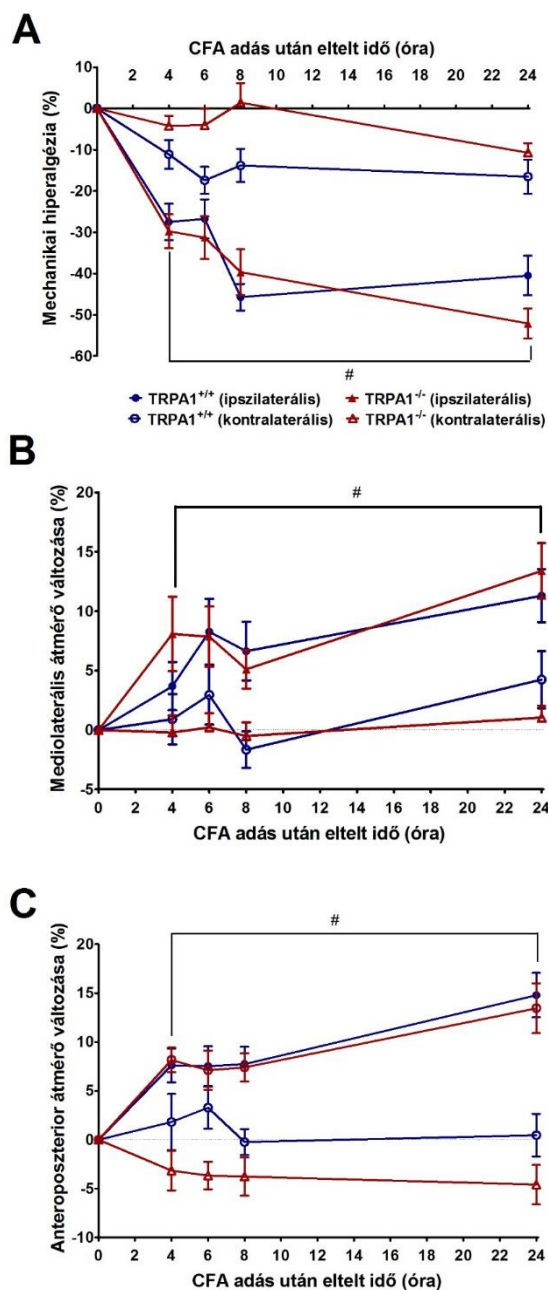
1 órával a karragenin i.pl. adását követően, azonban sem 1 óránál, sem a későbbi mérési időpontokban nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között (27.A,B ábra). Karragenin injekciót követően jelentős, 4-5°C fokos fájdalmas hőküszöb csökkenés volt megfigyelhető mindkét egértörzsben, azonban a 2. óránál a hőküszöb mindkét csoportban visszatért a kontroll értékre (27.C ábra). A 0°C fokos jeges vízben töltött idő mindkét csoportban közel felére csökkent a kontroll értékekhez képest karragenin adását követően (27.D ábra).



27. ábra Karragenin-indukált (A) mechanikai hiperalgéria, (B) lábduzzadás, (C) termális hiperalgéria és (D) hidegérzékenység TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} egerekben. N=7-13 egér/csoport, ###p<0,001 vs. kontralaterális láb (Bonferroni módosított poszttesztzel kiegészített 2-utas ANOVA).

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

4 órával az intraartikuláris (i.a.) CFA adást követően a TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} csoportban is hasonló mértékű, kb. 30%-os mechanikai hiperalgéria alakult ki, amely 8 óránál érte el a maximumát (40-50%) és számottevően nem is változott a 24 órás kísérlet végéig (28.A ábra). CFA jelentős térdízületi duzzadást idézett elő mindkét csoportban szignifikáns különbség nélkül. A térdízület mediolaterális és az anteroposzterior átmérői 24 óránál voltak a legnagyobbak (10-15%) (28.B,C ábra).



28. ábra CFA-indukált (A) mechanikai hiperalgémia és (B,C) térdízületi duzzadás TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} egerekben. N=11-12 egér/csoport, #p<0,05 vs. kontralaterális láb (Bonferroni módosított poszttesztzel kiegészített 2-utas ANOVA).

1.2. Új eredményeink összefoglalása

TRPA1^{-/-} egerekben a CFA-indukált krónikus mechanikai hiperalgémia, lábduzzadás, neutrofil MPO aktivitás, plazmafehérje extravazáció és szövettani károsodás szignifikánsan csökkent, míg a K/BxN szérum-indukált plazmafehérje kiáramlás szignifikánsan nőtt a TRPA1^{+/+} egerekhez képest. Ezzel szemben, krónikus CFA-modellben a termális hiperalgémia és a hidegérzékenység, K/BxN-modellben a mechanikai hiperalgémia, lábduzzadás, artritisz súlyossága és a neutrofil MPO aktivitás,

karragenin- és CFA-indukált akut gyulladás modellekben pedig a mechanikai- és termális hiperalgécia, az izületi duzzadás és a hidegérzékenység nem különbözött szignifikánsan a TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} csoport között (**1. táblázat**).

TRPV1^{-/-} egerekben a K/BxN szérumbelindukált mechanikai hiperalgécia és plazmafehérje extravázáció szignifikánsan csökkent, míg a lábduzzadás és az izületi gyulladás súlyossága szignifikánsan nőtt, a neutrofil MPO aktivitás azonban nem változott a WT csoporthoz képest (**1. táblázat**).

	Krónikus gyulladás			Akut gyulladás	
	CFA	K/BxN		Karragenin	CFA
	TRPA1 ^{-/-}	TRPV1 ^{-/-}	TRPA1 ^{-/-}	TRPA1 ^{-/-}	TRPA1 ^{-/-}
Mechanikai hiperalgécia	↓	↓	Ø	Ø	Ø
Lábduzzadás	↓	↑	Ø	Ø	n.v.
Térdátmérő	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	Ø
Artritisz pontszám	n.v.	↑	Ø	n.v.	n.v.
Termális hiperalgécia	Ø	n.v.	n.v.	Ø	n.v.
Hideg-érzékenység	Ø	n.v.	n.v.	Ø	n.v.
Neutrofil MPO aktivitás	↓	Ø	Ø	n.v.	n.v.
Plazmafehérje extravázáció	↓	↓	↑	n.v.	n.v.
Szöveti elváltozások	↓	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.

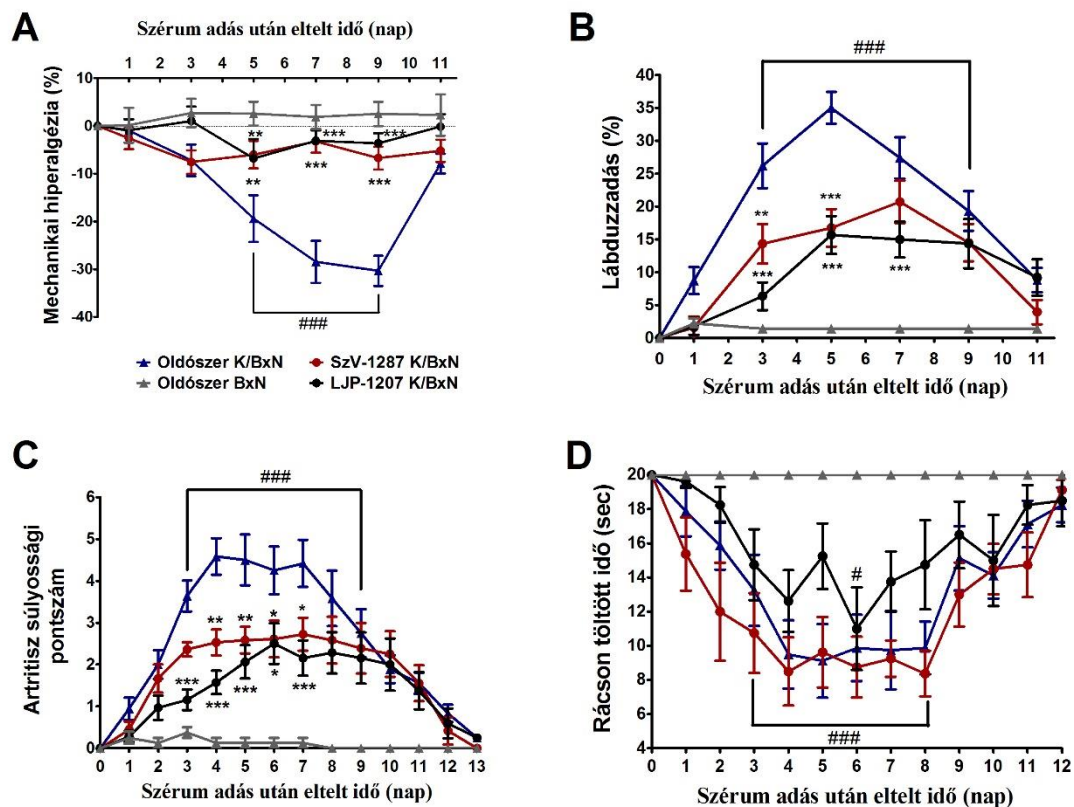
1. táblázat TRPA1 és/vagy TRPV1 génihiány hatása CFA- és K/BxN szérumbelindukált krónikus izületi gyulladás modell, illetve karragenin- és CFA-indukált akut gyulladás modell paramétereire. Jelmagyarázat: ↓: szignifikánsan csökkent a vad típusú csoporthoz képest; Ø: nem változott; n.v.: nem vizsgáltuk.

2. Az SSAO szerepe ízületi gyulladás és fájdalom egérmodelljeiben

2.1. Eredmények

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

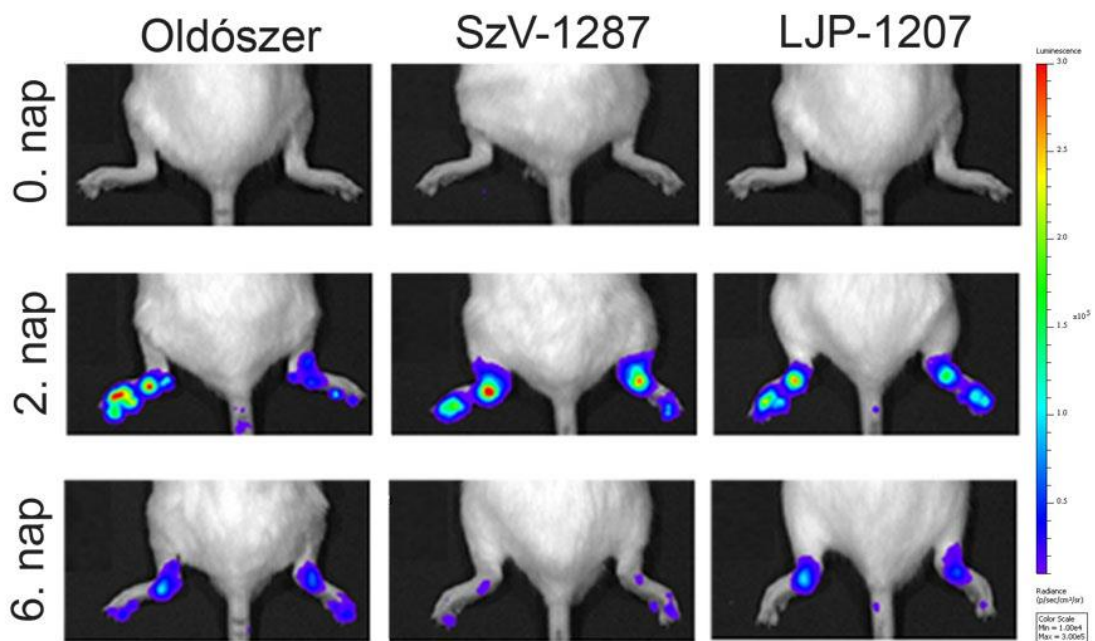
Az oldószerrel kezelt arthritiszos egereknél 20%-os mechanikai fájdalomküszöb csökkenést figyeltünk meg 5 nappal a K/BxN szérum adását követően, ami 8%-ra csökkent a 2 hetes kísérlet végére. A naponta SSAO-gátló (i.p. 20 mg/kg SzV-1287 és LJP-1207) kezelésben részesülő arthritiszos csoportoknál hasonló mértékű és szignifikánsan kisebb mechanonociceptív küszöb csökkenést detektáltunk a kísérlet 5-9. napja között **(29.A ábra)**. K/BxN szérum injekcióját követően jelentős ízületi duzzanat alakult ki a láb kisízületeiben és a bokaízületekben, amely a kísérlet 5. napján érte el a maximumát (35%). Ezt az ödémát mindkét SSAO-gátló vegyületünk szignifikánsan csökkentette, az LJP-1207-tel kezelt arthritiszos csoportban 15% (5. nap), az SzV-1287-tel kezeltékben 20% (7. nap) volt a lábtérfogat növekedés maximuma **(29.B ábra)**. Az arthritisz klinikai súlyosságát mutató szemikvantitatív pontszám 4. nap érte el maximumát az oldószerrel kezelt arthritiszos csoportban (4.58 ± 0.44 pont). Az SzV-1287 kezelésben részesülő csoportban a 4., az LJP-1207-tel kezeltékben a 3. naptól kezdve a 7. napig volt szignifikánsan kisebb arthritisz súlyossági pontszám megfigyelhető **(29.C ábra)**. Az arthritisz kiváltását követően csökkent az ízületi funkciót jelző rácson töltött idő, de ezt a paramétert egyik vegyület sem javította **(29.D ábra)**.



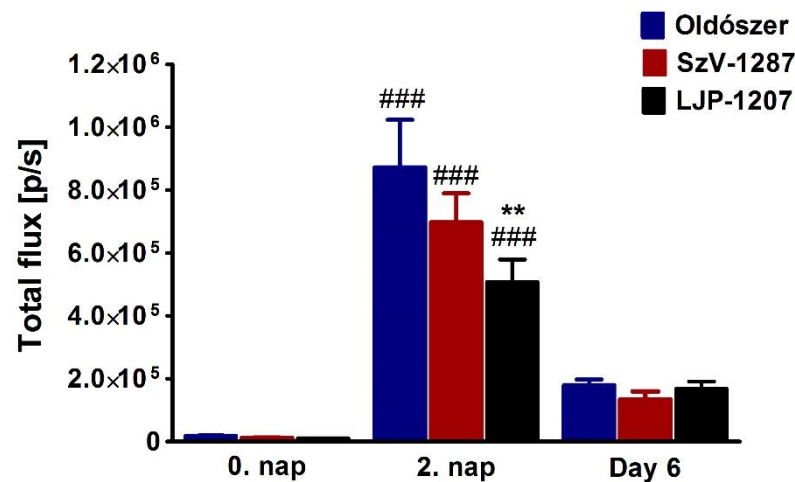
29. ábra K/BxN szérum-indukált (A) mechanikai hiperalgészia, (B) lábduzzadás, (C) artritisz súlyossági pontszám és (D) ízületi diszfunkció oldószerrel, SzV-1287-tel vagy LJP-1207-tel kezelt CD1 egerekben. N=8-9 egér/csoport, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. oldószerrel kezelt artritiszes csoport, # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ vs. oldószerrel kezelt nem artritiszes kontroll csoport (Bonferroni módosított poszttesztzel kiegészített 2-utas ANOVA).

2.1.2. LJP-1207 csökkenti a neutrofil MPO aktivitást K/BxN szérum-transzfer artritisz korai fázisában

A kemilumineszcens kontrasztanyag luminol segítségével vizualizálható neutrofil MPO aktivitás az oldószerrel és az SSAO-gátló vegyületekkel kezelt artritiszes egyedek bokaízületeiben is fokozódott 2 nappal a K/BxN szérum adást követően, azonban ezt csak az LJP-1207 csökkentette szignifikánsan (30., 31. ábra).



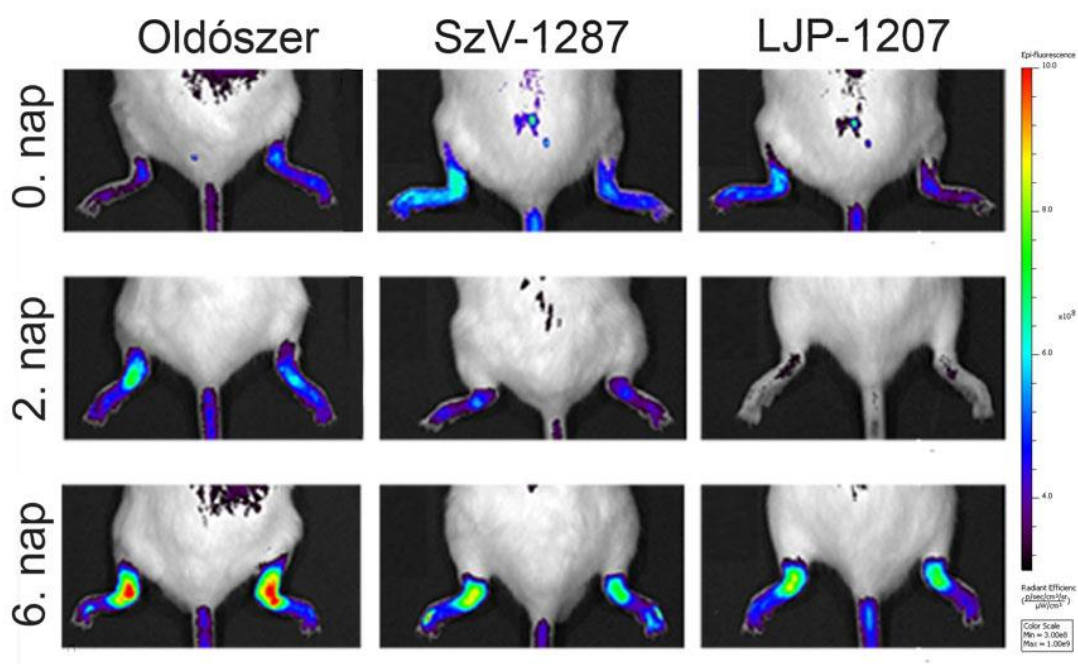
30. ábra Oldószerrel, SzV-1287-tel vagy LJP-1207-tel kezelt CD1 egerek K/BxN szérum-indukált neutrofil MPO aktivitását reprezentáló ábrái.



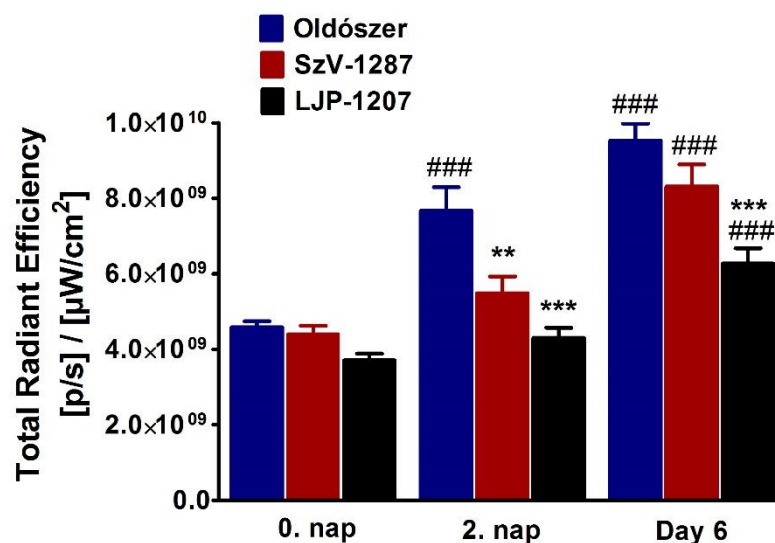
31. ábra K/BxN szérum-indukált neutrofil MPO aktivitás oldószerrel, SzV-1287-tel vagy LJP-1207-tel kezelt CD1 egerekben. N=6 egér/csoport, **p<0,01 vs. oldószerrel kezelt arthritiszes csoport, ###p<0,001 vs. saját 0. napi kontroll (Bonferroni módosított poszttesztzel kiegészített 1-utas ANOVA).

2.1.3. LJP-1207 a korai és a késői plazmafehérje extravazációt, míg SzV-1287 csak a korai ér áteresztőképességet csökkenti K/BxN szérum-transzfer arthritisben

K/BxN arthritis korai fázisában (2. nap) mindkét SSAO-gátló vegyület szignifikánsan csökkentette az IR-676 fluoreszcens festékkel kimutatható ér áteresztőképességet, míg késői fázisban (6. nap), amikor a plazmafehérje kiáramlás elérte a maximumát, csak az LJP-1207-tel kezelt csoportban figyeltünk meg szignifikáns csökkenést (32., 33. ábra).



32. ábra Oldószerrel, SzV-1287-tel vagy LJP-1207-tel kezelt CD1 egerek K/BxN szérum-indukált plazmafehérje extravazációját reprezentáló ábrái.



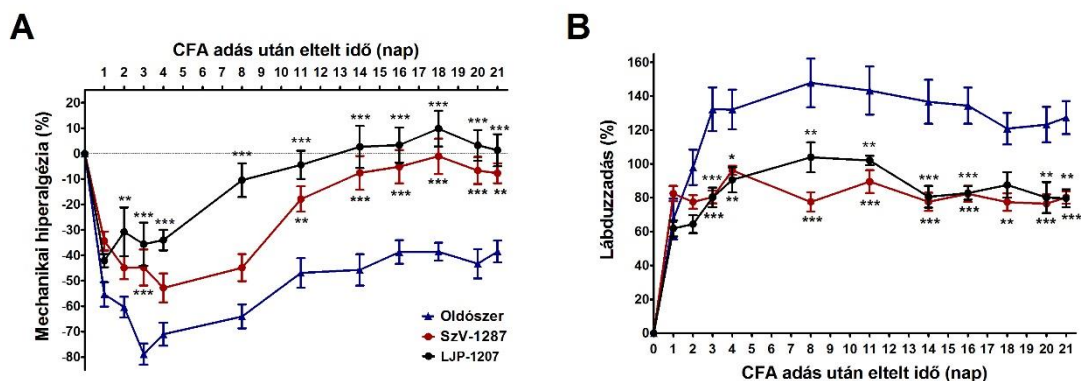
33. ábra K/BxN szérum-indukált plazmafehérje kiáramlás oldószerrel, SzV-1287-tel vagy LJP-1207-tel kezelt CD1 egerekben. N=6 egér/csoport, *p<0,01, **p<0,001 vs. oldószerrel kezelt artritiszes csoport, ###p<0,001 vs. saját 0. napi kontroll (Bonferroni módosított poszttesztel kiegészített 1-utas ANOVA).

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

Az oldószerrel, SzV-1287-tel és LJP-1207-tel kezelt egereknél is jelentős mechanonociceptív küszöb csökkenést tapasztaltunk 1 nappal a CFA i.pl. adását követően. Az oldószerrel kezelt csoportban a CFA-injektált végtagon 79%-os maximális hiperalgécia fejlődött ki 3 nap után, majd a 21 napos kísérlet végére 40%-ra csökkent. LJP-1207-tel kezelt csoportban 2-21. nap között, SzV-1287-tel kezelt csoportban 3. nap

és a 11-21. nap között szignifikánsan kisebb mechanikai hiperalgéziát figyeltünk meg (34.A ábra).

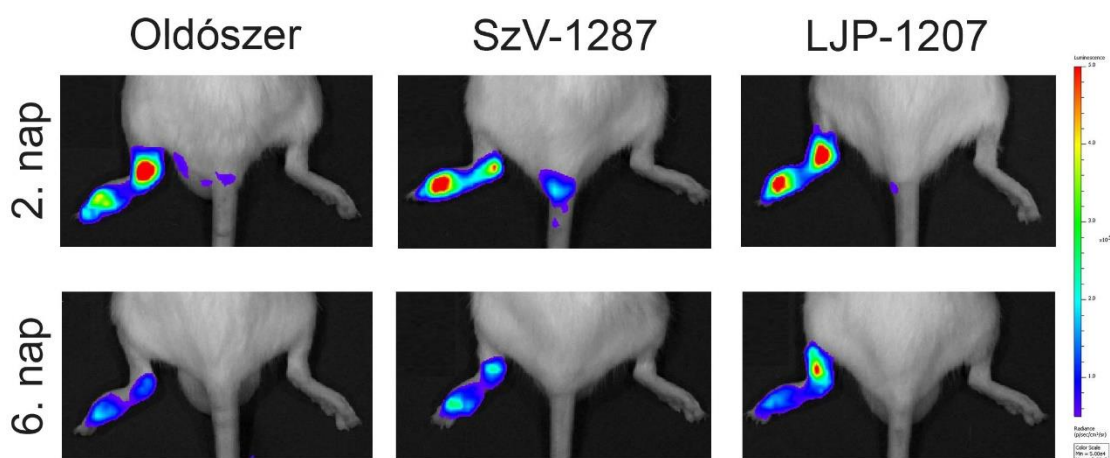
Az oldószerrel kezelt egereknél masszív, 148%-os lábtérfogat növekedés jött létre 8 nappal a CFA adást követően. Ennek kifejlődését azonban mindkét SSAO-gátló vegyület szignifikánsan csökkentette az egész kísérleti periódus során (34.B ábra).



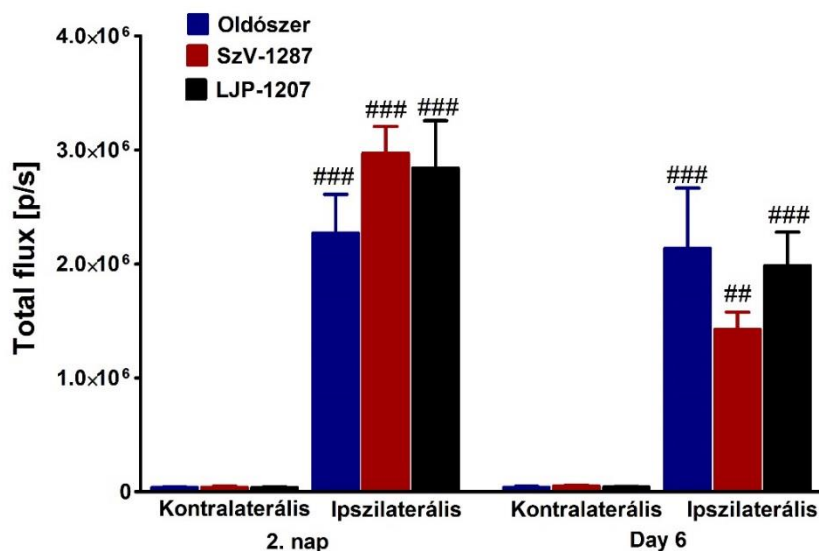
34. ábra CFA-indukált (A) mechanikai hiperalgéria és (B) lábduzzadás oldószerrel, SzV-1287-tel vagy LJP-1207-tel kezelt CD1 egerekben. N=6-8 egér/csoport, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. oldószerrel kezelt csoport (Bonferroni módosított poszttesttel kiegészített 2-utas ANOVA).

2.1.5. Egyik SSAO-gátló vegyület sem befolyásolta a CFA-indukált neutrofil MPO aktivitás mértékét

Az oldószerrel, az SzV-1287-tel és az LJP-1207-tel kezelt állatok tibiotarzáris ízületeiben is jelentős neutrofil MPO aktivitás volt látható CFA adását követően, azonban sem a 2., sem a 6. napon nem volt szignifikáns különbség az egyes csoportok között e tekintetben (35., 36. ábra).



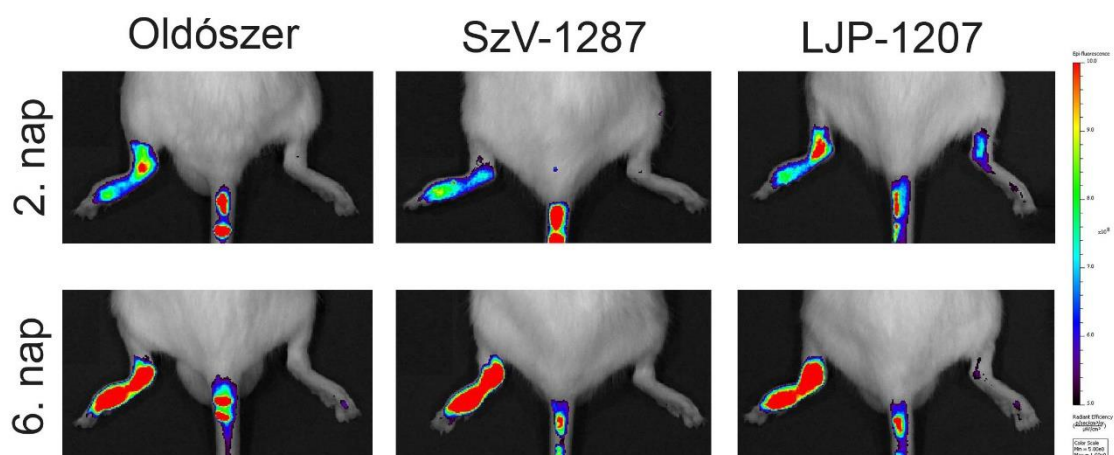
35. ábra Oldószerrel, SzV-1287-tel vagy LJP-1207-tel kezelt CD1 egerek CFA-indukált neutrofil MPO aktivitását reprezentáló ábrái.



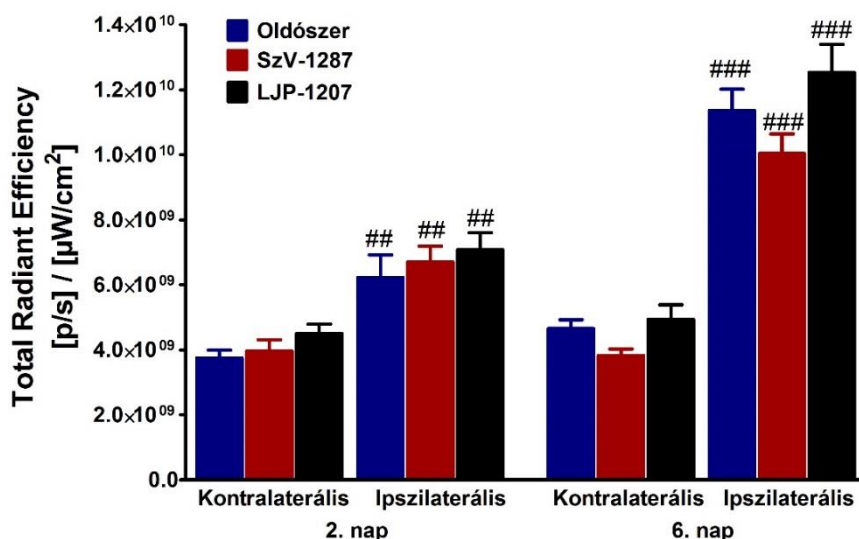
36. ábra CFA-indukált neutrofil MPO aktivitás oldószerrel, SzV-1287-tel vagy LJP-1207-tel kezelt CD1 egerekben. N=6 egér/csoport, ###p<0,001 vs. kontralaterális láb (Bonferroni módosított poszttesztzel kiegészített 1-utas ANOVA).

2.1.6. Egyik SSAO-gátló vegyület sem befolyásolta a CFA-indukált plazmafehérje extravazáció mértékét

Az oldószerrel, az SzV-1287-tel és az LJP-1207-tel kezelt csoportok CFA-injektált hátsó végtagjaiban is jelentős érpermeabilitás fokozódás volt megfigyelhető az arthritisz korai fázisában (2. nap), amely tovább fokozódott a késői fázisban (6. nap). Szignifikáns különbséget azonban találtunk az egyes csoportok között (37., 38. ábra).



37. ábra Oldószerrel, SzV-1287-tel vagy LJP-1207-tel kezelt CD1 egerek K/BxN szérum-indukált plazmafehérje extravazációját reprezentáló ábrái.



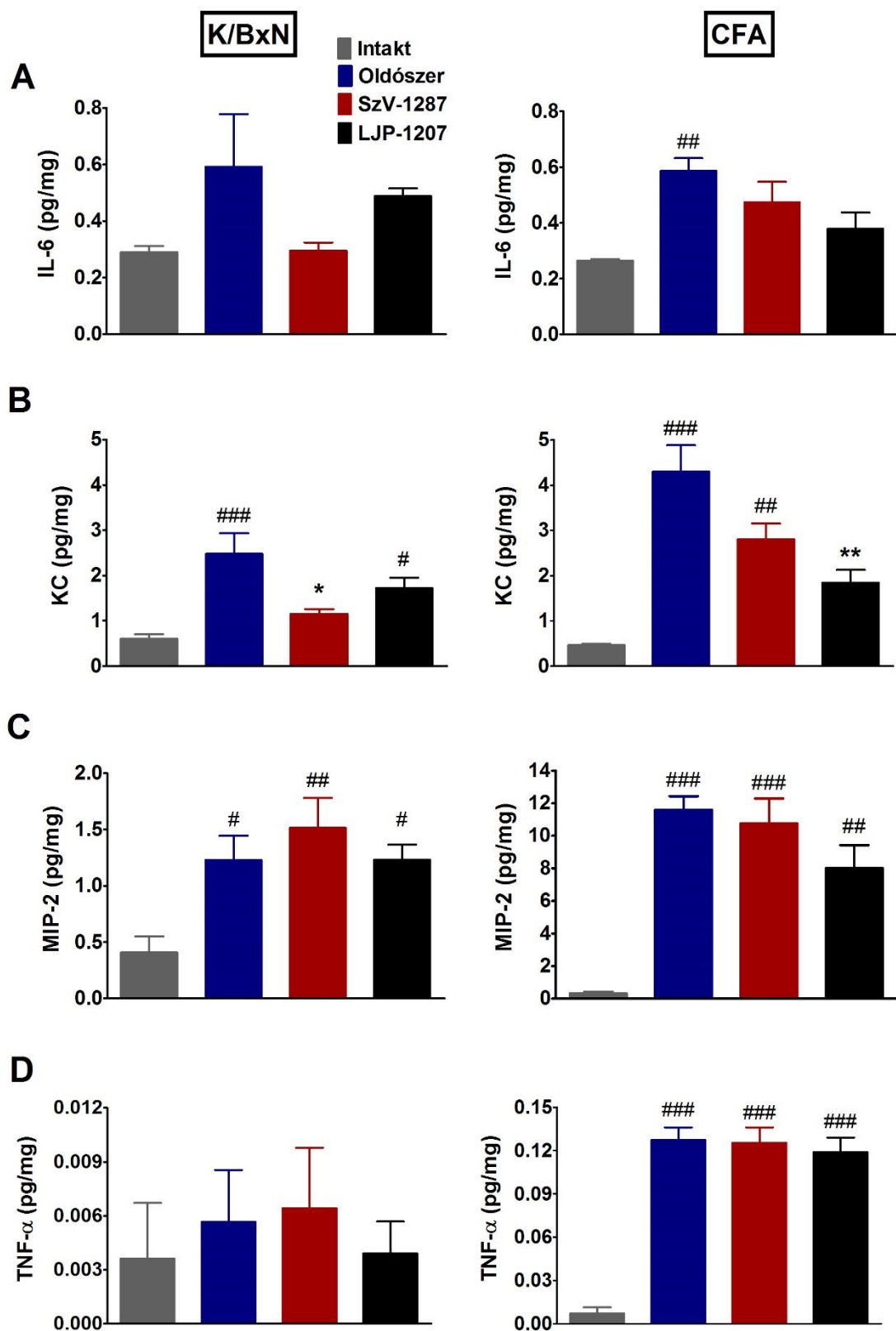
38. ábra CFA-indukált plazmafehérje kiáramlás oldószerrel, SzV-1287-tel vagy LJP-1207-tel kezelt CD1 egerek tibiotarzáris ízületeiben. N=6 egér/csoport, ##p<0,01, ###p<0,001 vs. kontralaterális láb (Bonferroni módosított poszttesztel kiegészített 1-utas ANOVA).

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

K/BxN vagy BxN szérum adását követő 4. napon az oldószerrel kezelt artritiszes CD1 egerek ízületi homogenizátumában KC és MIP-2 koncentrációja is szignifikánsan megemelkedett a nem artritiszes állatokhoz képest, míg IL-6 és TNF- α koncentrációja nem különbözött szignifikánsan a két csoport között. A vizsgált proinflammatorikus citokinek közül SzV-1287 kizárólag KC koncentrációját tudta szignifikánsan csökkenteni ebben az időpontban, míg LJP-1207 egyik citokin szintjét sem befolyásolta szignifikánsan (39.A-D ábra).

CFA-indukált artritiszben drasztikusan nagyobb citokin koncentrációkat mértünk ugyanebben az időpontban, különösen MIP-2 és TNF- α tekintetében tapasztaltunk jelentős dimenzióbeli eltéréseket. IL-6, KC, MIP-2 és TNF- α koncentrációja is szignifikánsan magasabb volt az oldószerrel kezelt csoport artritiszes tibiotarzáris ízületi homogenizátumaiban az intakt csoporthoz viszonyítva. K/BxN szérum-transzfer artrisszel ellentétben KC koncentrációját LJP-1207 csökkentette szignifikánsan, bár az SzV-1287-tel kezelt csoportban is kisebb koncentrációt tapasztaltunk. A többi vizsgált gyulladásos citokin szintjét egyik vegyület sem befolyásolta szignifikánsan (39.A-D ábra).

A vizsgált öt citokin közül egyik plazmakoncentrációja sem emelkedett meg az artritiszes állatokban a kísérletek 4. napján, illetve ugyanez elmondható az IL-1 β ízületi homogenizátumban mért koncentrációjáról is (az adatokat nem ábrázoltuk).

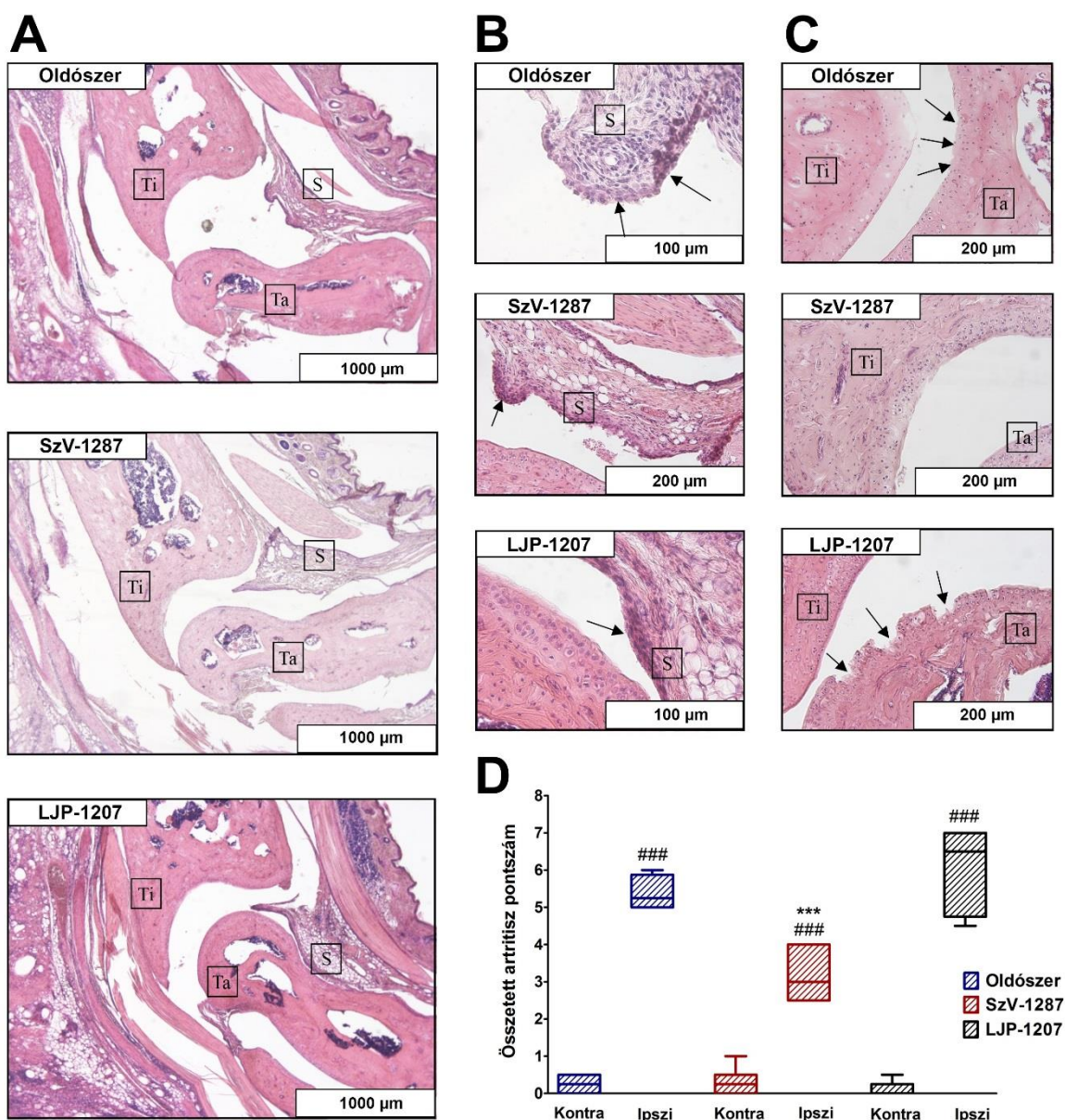


39. ábra Oldószerrel, SzV-1287-tel és LJP-1207-tel kezelt artitiszos CD1 egerek tibiotarzáris ízületi homogenizátumainak (A) IL-6, (B) KC, (C) MIP-2 és (D) TNF- α koncentrációja a kísérlet 4. napján. N=4-6 egér/csoport, *p<0,05, **p<0,01 vs. oldószerrel kezelt csoport, #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 vs. nem artitiszos kontroll vagy intakt csoport (Bonferroni módosított poszttesztel kiegészített 1-uta ANOVA).

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

CFA az oldószerrel kezelt állatok bal tibiotarzáris ízületeiben artritiszre jellemző szövettani elváltozásokat, szinoviális hiperpláziát, mononukleáris sejt infiltrációt és porcdestrukciót eredményezett. Az SzV-1287-tel kezelt csoportban az említett elváltozások közül csak a szinoviális sejtréteg hiperpláziájának mértéke volt hasonló az oldószerrel kezeltékéhez, emellett jelentősen kisebb gyulladásos sejt beáramlás és minimális porckárosodás volt megfigyelhető. Az LJP-1207-tel kezelt állatok bokaízületeiben bár valamivel kisebb mononukleáris sejt infiltráció volt látható a szinoviumban az oldószerrel kezelt csoporthoz képest, azonban a porcdestrukció és a szinoviális hiperplázia súlyosabbnak bizonyult **(40.A-C ábra)**.

Az említett hisztopatológiai paraméterek szemikvantitatív értékelése során csak az SzV-1287-tel kezelt csoportban találtunk szignifikánsan kisebb összetett artritisz pontszámot az oldószerrel kezelt csoporthoz képest **(40.D ábra)**.

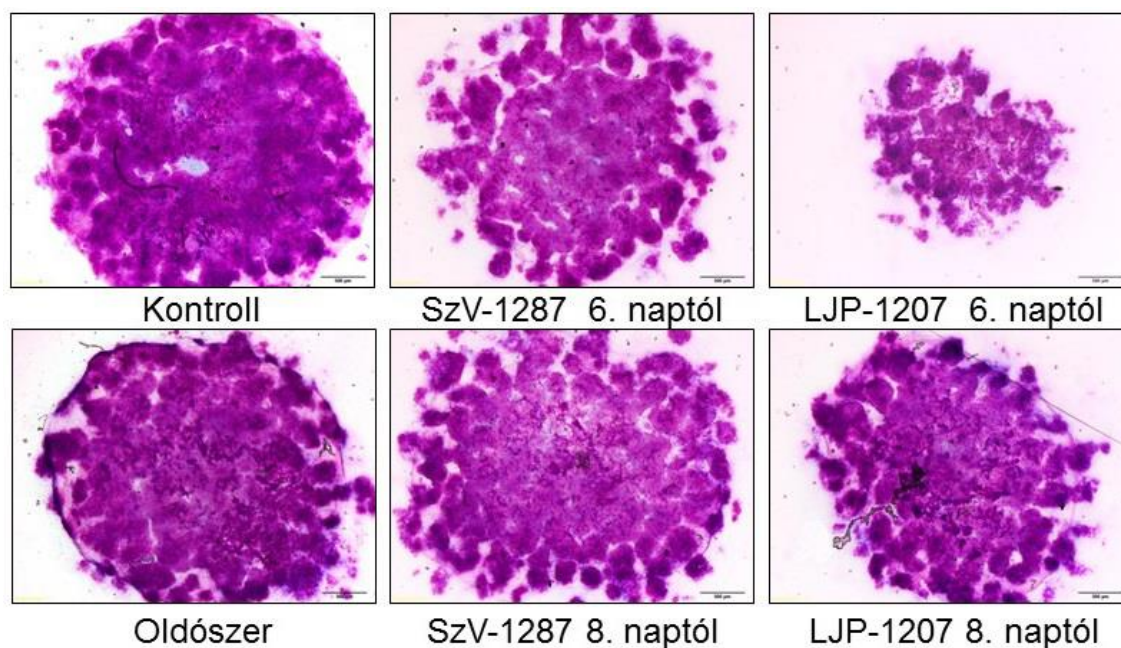


40. ábra (A-C) Oldószerrel-, SzV-1287-tel, LJP-1207-tel kezelt CD1 egerek tibiotarzáls ízületeinek CFA-indukált szövettani elváltozásai (A: 40x, C (SzV-1287): 100x, B (SzV-1287), C (oldószer, LJP-1207): 200x, B (oldószer, LJP-1207): 400x nagyítás, Ti: tibia, Ta: tarsus, S: szinovium) és (D) összetett arthritisz pontszámai. N=4-8 egér/csoport, ***p<0,001 vs. oldószerrel kezelt arthritiszes csoport ipszilaterális bokázületei, ###p<0,001 vs. kontralaterális bokaizület (Bonferroni módosított poszttesztel kiegészített 1-utas ANOVA).

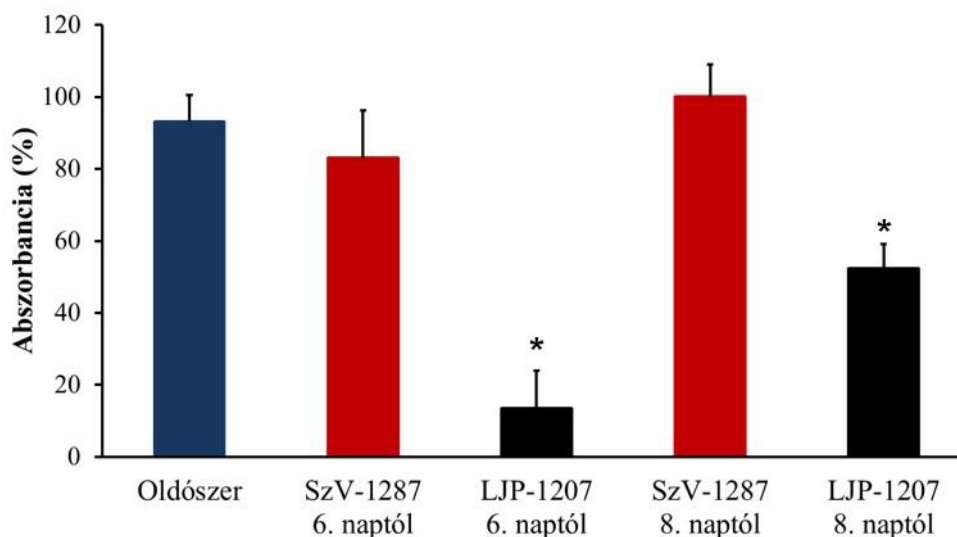
2.1.9. LJP-1207 csökkenti a metakromáziásan festődő porcmátrix mennyiségét „micromass” sejtkultúrában

Az *in vivo* eredményeinkkel összhangban, SzV-1287 csak enyhén gátolta a porcmátrix termelődését *in vitro*. A 10. tenyésztési nap nem találtunk szignifikáns különbséget a 6., illetve a 8. naptól folyamatosan SzV-1287-tel és az oldószerrel kezelt sejtkultúrák között. Ezzel ellentétben a 6. és 8. naptól kezdett LJP-1207 kezelés is szignifikánsan csökkentette a metakromáziásan festődő porcmátrix mennyiségét a porcosodó mezenchimális

sejtkultúrákban, amely a DMMK-val és TK-val festett telepeken is jól látható volt (41., 42. ábra).



41. ábra A metakromáziásan festődő porc telepek reprezentatív ábrái dimetilmetilénkékkel (DMMK) festett, 6. és 8. tenyésztési naptól oldószerrel, SzV-1287-tel és LJP-1207-tel kezelt "micromass" sejtkultúrában a 10. tenyésztési napon (4x nagyítás, skála: 500 µm).



42. ábra A metakromáziásan festődő porcmátrix mennyiségének szemivantitív értékelése toluidinkékkel (TK) festett, 6. és 8. tenyésztési naptól oldószerrel, SzV-1287-tel és LJP-1207-tel kezelt „micromass” sejtkultúrában 10. tenyésztési napon. N=3 sejtkultúra/csoport, * $p < 0,05$ vs. oldószerrel kezelt sejtkultúra (Student-féle kétmintás t-teszt).

2.2. Új eredmények összefoglalása

SzV-1287 és LJP-1207 szignifikánsan csökkentette a CFA- és K/BxN-szérum indukált mechanikai hiperalgéziát és lábduzzadást, a K/BxN szérum-indukált artritisz súlyosságát és a plazmafehérje kiáramlást. A K/BxN szérum-indukált neutrofil MPO aktivitást csak LJP-1207 csökkentette, míg a CFA-indukált szövettani destrukció mértékét csak SzV-1207. A K/BxN szérum-indukált ízületi diszfunkciót, a CFA-indukált neutrofil MPO aktivitást és a plazmafehérje kiáramlást egyik SSAO-gátló vegyület sem befolyásolta (2. táblázat).

	CFA-modell		K/BxN-modell	
	SzV-1287	LJP-1207	SzV-1287	LJP-1207
Mechanikai hiperalgéria	↓	↓	↓	↓
Lábduzzadás	↓	↓	↓	↓
Artritisz pontszám	n.v.	n.v.	↓	↓
Ízületi funkció	n.v.	n.v.	Ø	Ø
Neutrofil MPO aktivitás	Ø	Ø	Ø	↓
Plazmafehérje extravazáció	Ø	Ø	↓	↓
Szövettani elváltozások	↓	Ø	n.v.	n.v.

2. táblázat SzV-1287- és LJP-1207-kezelés hatásai CFA- és K/BxN szérum-indukált artritisz modell paramétereire. Jelmagyarázat: ↓: szignifikánsan csökkent az oldószerezelt csoporthoz képest; Ø: nem változott; n.v.: nem vizsgáltuk.

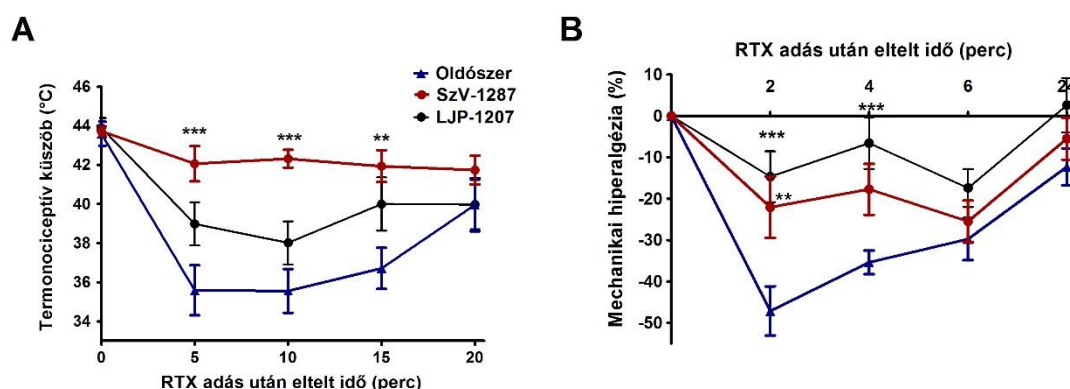
3. A TRPA1 és TRPV1 receptorok és az SSAO kapcsolata ízületi gyulladás és fájdalom egérmodelljeiben

3.1. Eredmények

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

Már 5 perccel a szelektív TRPV1 agonista RTX i.pl. adását követően jelentős, kb. 8°C fokos fájdalmas hőküszöb csökkenés alakult ki az oldószerrel kezelt csoportban, ami még 15 percig fennállt. Ez a gyorsan kialakuló, akut termális hiperalgémia szignifikánsan kisebb volt az SzV-1287-tel kezelt egerekben, az LJP-1207 kezelt csoport esetén azonban az oldószerrel kezelthez hasonló csökkenést mértünk (43.A ábra).

2 órával az RTX adását követően kb. 45%-os mechanonociceptív küszöbcsökkenést tapasztaltunk az oldószerrel kezelt csoportban, ami fokozatosan csökkent, majd megszűnt a 24 órás kísérlet végére. A 2 órás mérésnél SzV-1287 és LJP-1207 is, a 4 órásnál csak LJP-1207 csökkentette szignifikánsan a centrális szenzitizációs mechanizmusoknak is köszönhető mechanikai hiperalgéziát (43.B ábra).



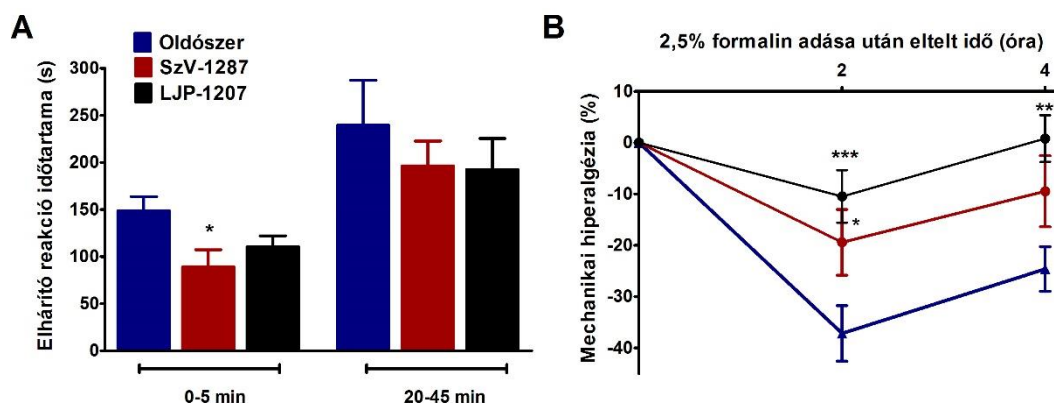
43. ábra RTX-indukált (A) termális és (B) mechanikai hiperalgémia oldószerrel, SzV-1287-tel és LJP-1207-tel kezelt WT egerekben. N=7-8 egér/csoport, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. oldószerrel kezelt csoport (Bonferroni módosított poszttesztel kiegészített 1-utas ANOVA).

3.1.2. SzV-1287 csökkenti a TRPA1 aktiváció-indukált akut nocifenzív reakció és mechanikai hiperalgémia mértékét

Az oldószerrel kezelt csoportban a TRPA1 agonista formalin i.pl. adása által kiváltott elhárító reakció időtartama $148,7 \pm 15,6$ s volt a teszt korai (0-5 perc) és $239,7 \pm 47,7$ s volt a késői fázisában (20-45 perc). Korai fázisban az érző idegvégződés közvetlen aktivációja által kiváltott elhárító reakció időtartama szignifikánsan rövidebb volt SzV-1287-tel

kezelt csoportban, míg a késői fázisban, amikor már a neurogén gyulladásos reakció is létrejött, nem találtunk szignifikáns különbséget a csoportok között (**44.A ábra**).

2 órával a formalin adása után 35%-os mechanikai hiperalgémia jött létre az oldószerrel kezelt csoportban. Az RTX modellhez hasonlóan 2 és 4 óránál mindkét SSAO-gátló vegyület, 4 óránál csak LJP-1207 csökkentette szignifikánsan a mechanikai fájdalomküszöb csökkenés mértékét (**45.B ábra**).

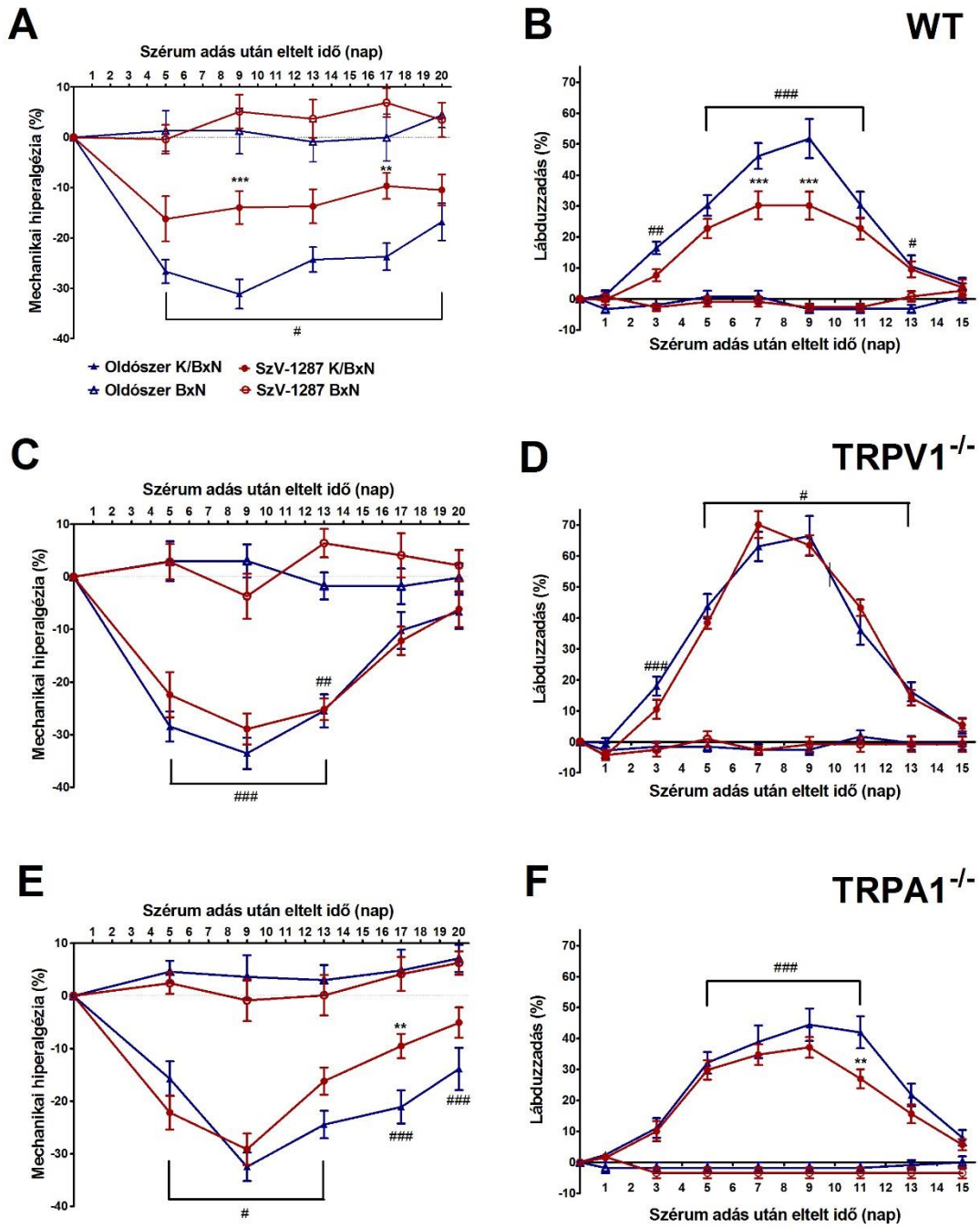


44. ábra Formalin-indukált (A) akut elhárító reakció és (B) mechanikai hiperalgémia oldószerrel, SzV-1287-tel és LJP-1207-tel kezelt WT egerekben. N=7-8 egér/csoport, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. oldószerrel kezelt csoport (elhárító reakció időtartama: Student-féle kétmintás t-teszt; hiperalgémia: Bonferroni módosított poszttesztel kiegészített 1-utas ANOVA).

3.1.3. SzV-1287 csökkenti a krónikus mechanikai hiperalgémia és ödémát artritises WT és TRPA1^{-/-} egerekben

Az oldószerrel kezelt WT csoportban kb. 25-30%-os mechanikai fájdalomküszöb csökkenés alakult ki a kísérlet 5. napjára. A napi rendszerességgel alkalmazott i.p. 20 mg/kg SzV-1287 WT csoportban a 9. és a gyulladás lezajlását követően a 17. napon, TRPA1^{-/-} csoportban pedig a 17. napon csökkentette szignifikánsan a K/BxN szérumban indukált mechanikai hiperalgémia, a TRPV1^{-/-} egerekben azonban nem figyeltünk meg analgetikus hatást (**46.A-C ábra**).

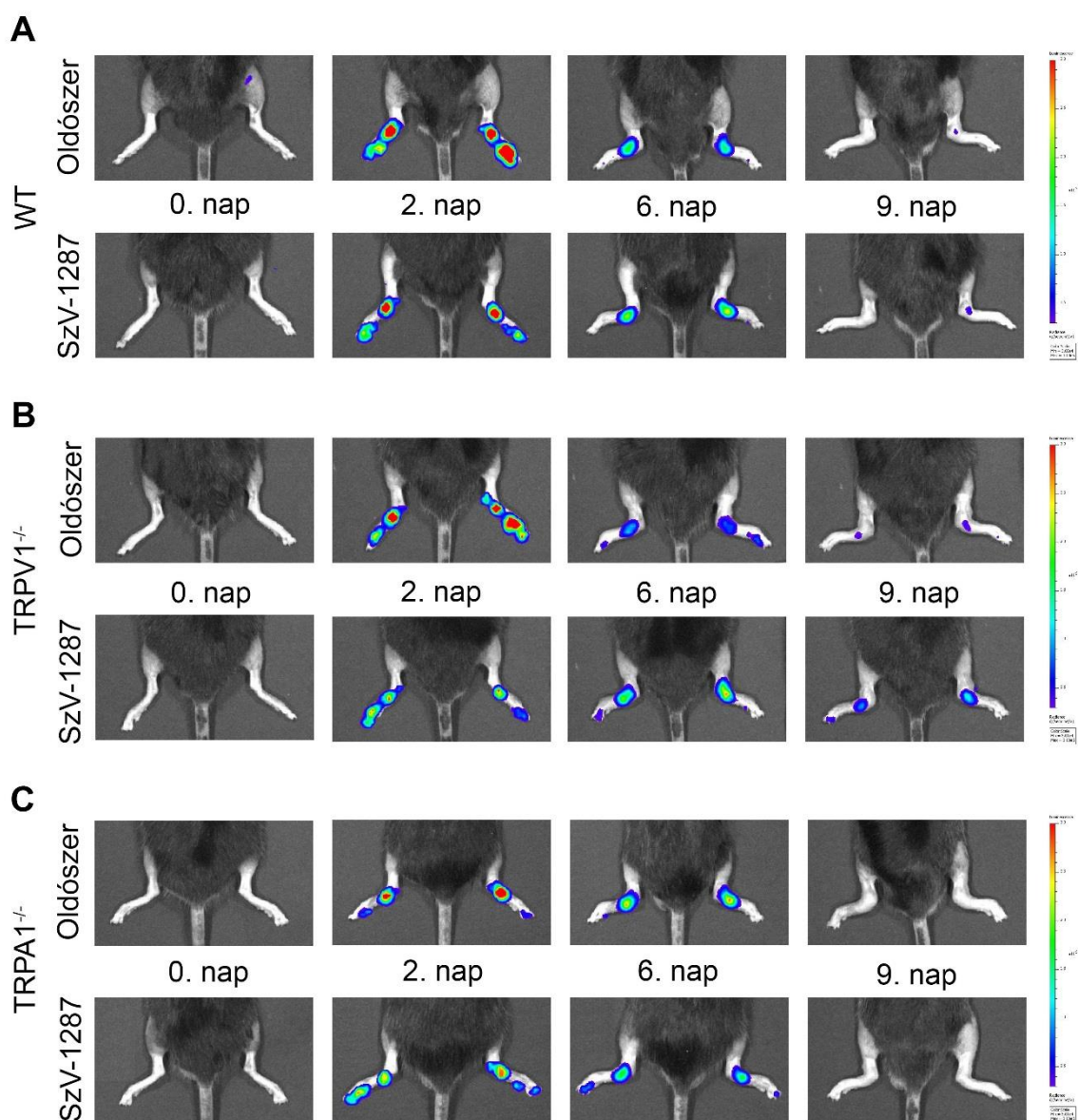
A mechanikai hiperalgémia mellett jelentős lábtérfogad növekedés is detektálható volt mindegyik artritises csoportban, amely 9. napra érte el maximumát (WT: 50%, TRPV1^{-/-}: 65%, TRPA1^{-/-}: 45%). Az artritises WT és TRPA1^{-/-} csoportban SzV-1287 szignifikánsan csökkentette a lábduzzadást, az SzV-1287 kezelt WT csoportban kb. 30% (7. nap), a TRPA1^{-/-} csoportban 37% (9. nap) volt a maximális lábtérfogad növekedés. Ezzel szemben, SzV-1287 egyáltalán nem befolyásolta az ödéma mértékét az artritises TRPV1^{-/-} csoportban (**46.D-F ábra**).



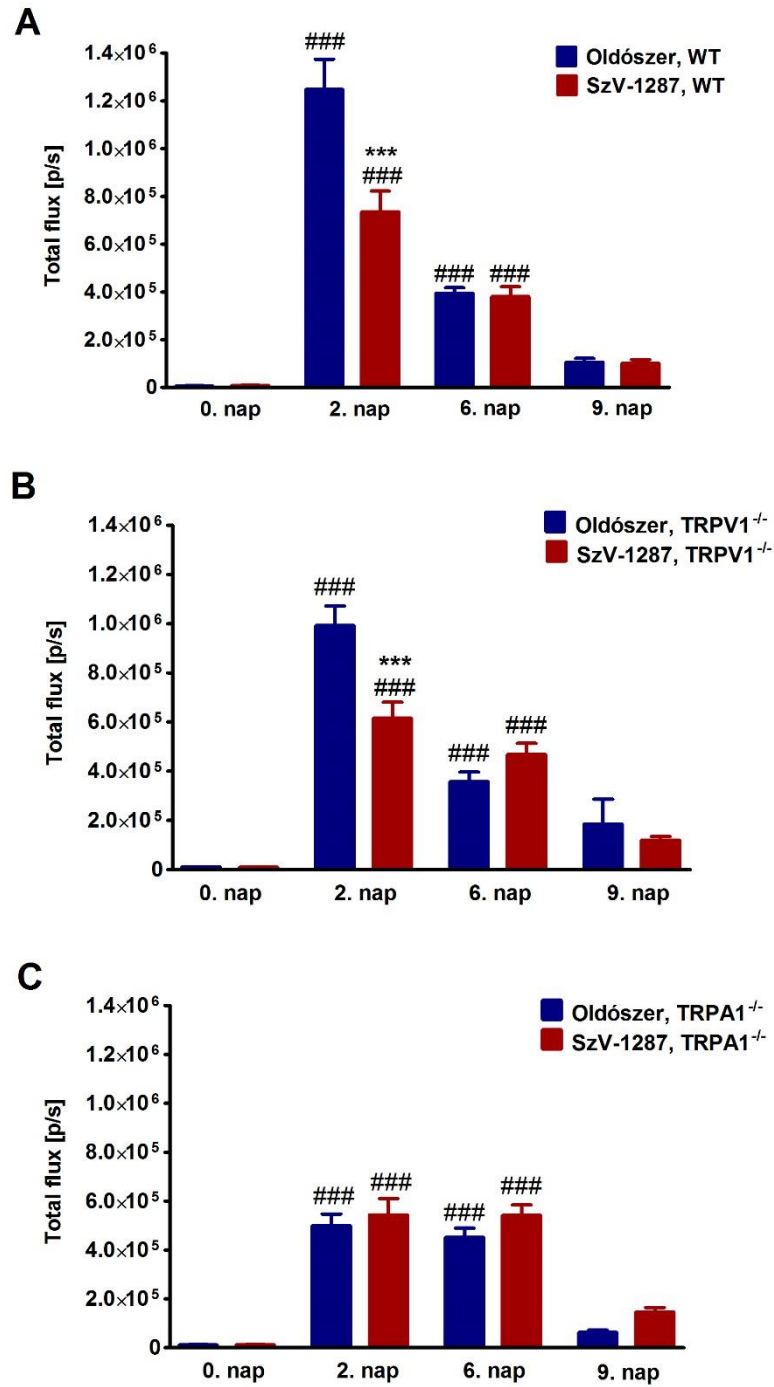
45. ábra K/BxN szérum-indukált mechanikai hiperalgészia és lábduzzadás oldószerrel és SzV-1287-tel kezelt (A,B) WT, (C,D) TRPV1^{-/-} és (E,F) TRPA1^{-/-} egerekben. N=4-15 egér/csoport, **p<0,01, ***p<0,001 vs. oldószerrel kezelt arthritiszos csoport, #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 vs. nem arthritiszos kontroll csoport (Bonferroni módosított poszttesztel kiegészített 2-utas ANOVA).

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

WT csoport artritiszes bokaízületeiben a fokozott neutrofil MPO aktivitást demonstráló intenzív biolumineszcencia volt detektálható a kísérlet 2. napján, amely azonban jelentősen lecsökkent a 9. napra. Az SzV-1287 kezelés hatására korai fázisban szignifikánsan kisebb MPO aktivitás volt megfigyelhető WT és TRPV1^{-/-} egerek artritiszes ízületeiben, TRPA1^{-/-} csoportban nem volt ilyen jellegű hatása (46., 47. ábra).



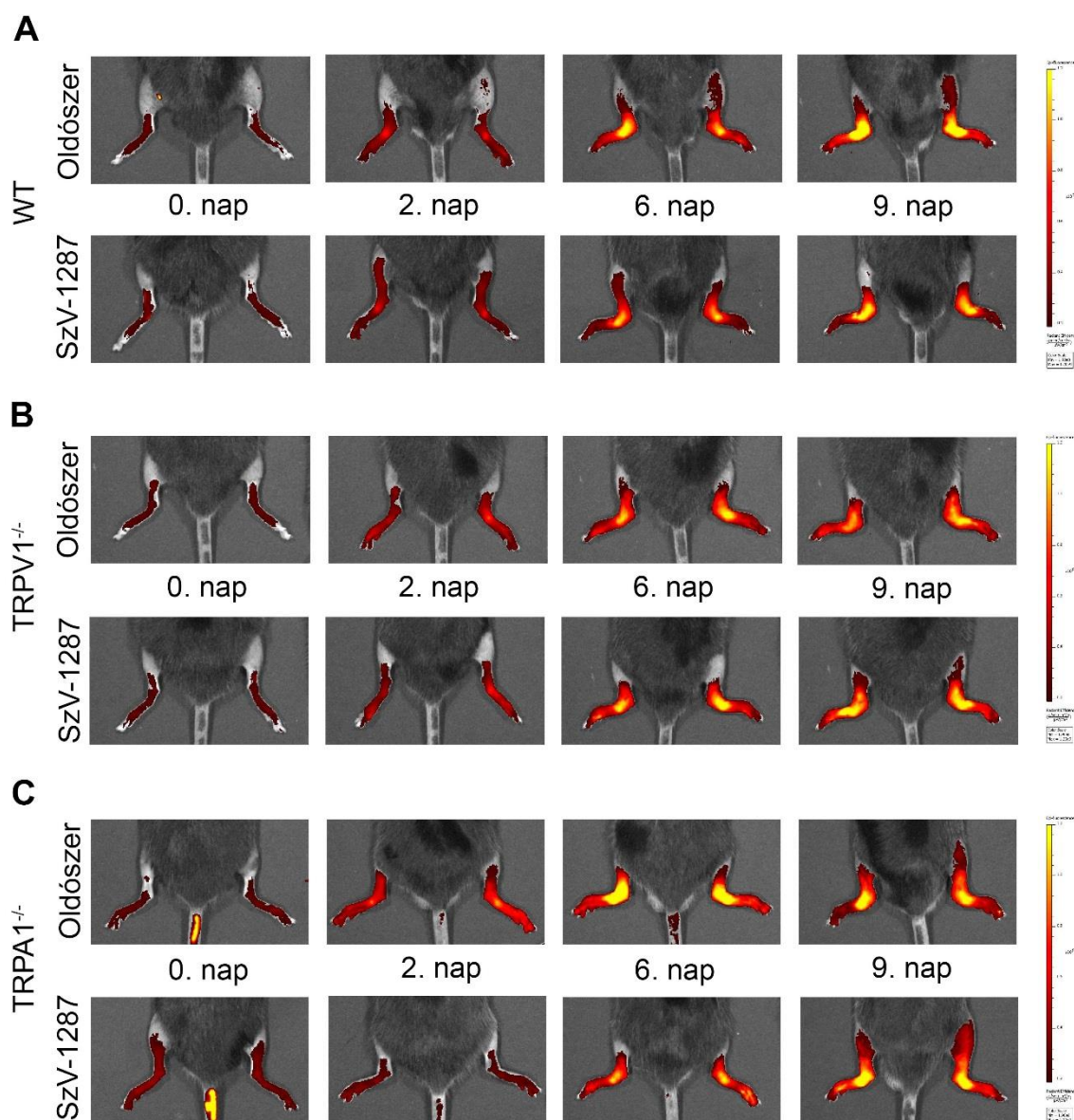
46. ábra Oldószerrel és SzV-1287-tel kezelt (A) WT, (B) TRPV1^{-/-} és (C) TRPA1^{-/-} egerek K/BxN szérum-indukált neutrofil MPO aktivitásának reprezentatív ábrái.



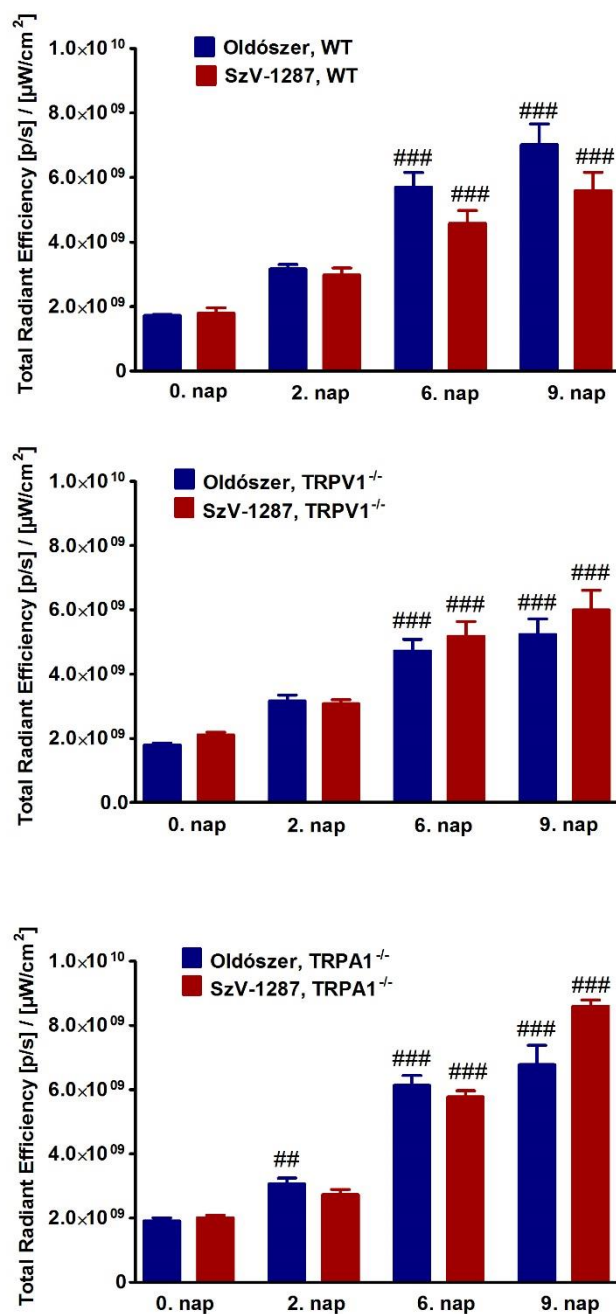
47. ábra K/BxN szérum-indukált neutrofil MPO aktivitás oldószerrel vagy SzV-1287-tel kezelt (A) WT, (B) TRPV1^{-/-} és (C) TRPA1^{-/-} egerek tibiotarzáris ízületeiben. N=7-15 egér/csoport, ***p<0,001 vs. oldószerrel kezelt arthritiszos csoport, ###p<0,001 vs. 0. napi saját kontroll (Bonferroni módosított poszttesztel kiegészített 1-utas ANOVA).

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

A vaszkuláris permeabilitás fokozódást jelző fluoreszcens jelintenzitás 2. naptól kezdve fokozatosan emelkedett mindegyik artritiszes törzsben, majd a 9. napon elérte a maximumát, az SzV-1287 kezelés azonban egyik csoportban sem befolyásolta ezt a paramétert (48., 49. ábra).



48. ábra Oldószerrel és SzV-1287-tel kezelt (A) WT, (B) TRPV1^{-/-} és (C) TRPA1^{-/-} egerek K/BxN szérum-indukált plazmafehérje extravazációjának reprezentatív ábrái.

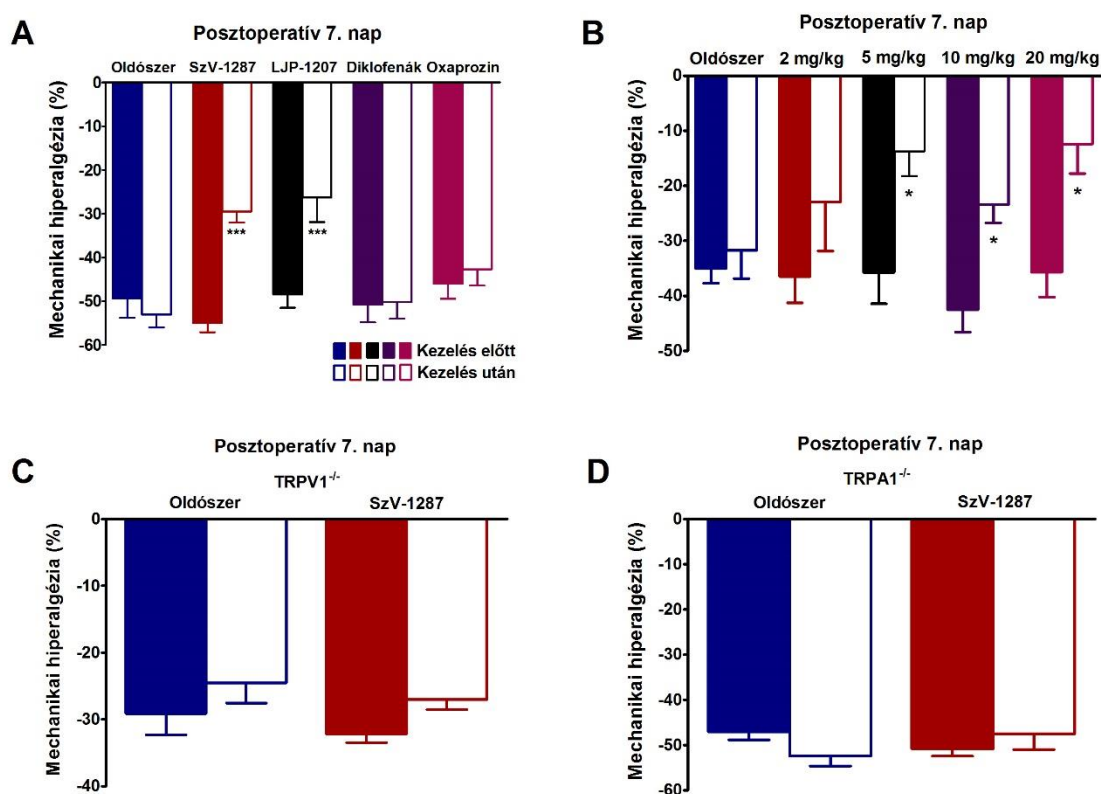


49. ábra K/BxN szérum-indukált plazmafehérje extravazáció oldószerrel vagy SzV-1287-tel kezelt (A) WT, (B) TRPV1^{-/-} és (C) TRPA1^{-/-} egerek tibiotarzáris ízületeiben. N=7-15 egér/csoport, ##p<0,01, ###p<0,001 vs. 0. napi saját kontroll (Bonferroni módosított poszttesztzel kiegészített 1-utas ANOVA).

3.1.6. SzV-1287 csökkenti a neuropátiás mechanikai hiperalgéziát

Traumás mononeuropátia modell 7. napján, amikor már stabil mechanikai fájdalomküszöb csökkenés volt detektálható, egyszeri i.p. SzV-1287 előkezelés analgetikus hatását vizsgáltuk oldószerével, egy referencia SSAO-gátló vegyülettel (LJP-1207), aktív metabolitjával (oxaprozin) és egy referencia NSAID-dal (diklofenák) összehasonlítva.

A vizsgált vegyületek közül csak az SSAO-gátló vegyületek csökkentették szignifikánsan a mechanikai hiperalgéziát (**50.A ábra**). Megvizsgáltuk, hogy SzV-1287 dózis függő módon csökkenti-e a mechanikai fájdalomküszöb csökkenést, azonban 5, 10 és 20 mg/kg dózisban is hasonló mértékű, kb. 50-60%-os antihiperalgéziás hatást figyeltünk meg. 2 mg/kg dózisban nem eredményezett szignifikáns fájdalomküszöb csökkenést (**50.B ábra**). WT csoporttal ellentétben TRPV1^{-/-} és TRPA1^{-/-} csoportokban SzV-1287 nem csökkentette a neuropátiás mechanikai hiperalgéziát (**50.C,D ábra**). WT és a génhiányos csoportok között szintén nem találtunk szignifikáns különbséget e tekintetben (az adatokat nem ábrázoltuk).



50. ábra A mechanikai hiperalgédia 7 nappal a n. ischiadicus parciális lekötését követően (A) i.p. oldószerrel, 20 mg/kg SzV-1287-tel, LJP-1207-tel, diklofenákkal vagy oxaprozinnal kezelt WT egerekben, (B) i.p. oldószerrel vagy SzV-1287 különböző dózisaival kezelt WT egerekben, i.p. oldószerrel vagy 20 mg/kg SzV-1287-tel kezelt (C) TRPV1^{-/-} egerekben és (D) TRPA1^{-/-} egerekben. N=5-9 egér/csoport, *p<0,05, ***p<0,001 vs. kezelés előtti kontroll értékek (Bonferroni módosított poszttesztzel kiegészített 1-utas ANOVA).

3.2. Új eredmények összefoglalása

SzV-1287-kezelés (20 mg/kg i.p.) szignifikánsan csökkentette WT egerekben a TRPV1 aktiváció-indukált akut termális és mechanikai hiperalgéziát, a TRPA1 aktiváció-indukált akut fájdalomelhárító reakciót és mechanikai hiperalgéziát, WT és TRPA1^{-/-} egerekben a K/BxN szérum-indukált mechanikai hiperalgéziát és lábduzzadást, WT és TRPV1^{-/-} egerekben a neutrofil MPO aktivitást, illetve WT egerekben a neuropátiás hiperalgéziát. Ezzel szemben TRPV1^{-/-} egerekben a K/BxN szérum-indukált mechanikai hiperalgézia és lábduzzadás, TRPA1^{-/-} egerekben a neutrofil MPO aktivitás tekintetében nem volt szignifikáns különbség az oldószerrel és SzV-1287-tel kezelt csoport között. A K/BxN szérum-indukált plazmafehérje extravazáció mértékét SzV-1287 egyik egértörzsben sem csökkentette. A n. ischiadicus parciális lekötése által kiváltott krónikus neuropátiás hiperalgéziát sem TRPV1^{-/-}, sem TRPA1^{-/-} egerekben nem csökkentette az oldószerrel kezelt csoporthoz képest (**3. táblázat**).

	Akut fájdalom		Krónikus fájdalom					
	RTX	Formalin	K/BxN			Seltzer		
	TRPV1	TRPA1	WT	TRPV1 ^{-/-}	TRPA1 ^{-/-}	WT	TRPV1 ^{-/-}	TRPA1 ^{-/-}
Termális hiperalgézia	↓	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
Elhárító reakció	n.v.	↓	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
Mechanikai hiperalgézia	↓	↓	↓	Ø	↓	↓	Ø	Ø
Lábduzzadás	n.v.	n.v.	↓	Ø	↓	n.v.	n.v.	n.v.
Neutrofil MPO aktivitás	n.v.	n.v.	↓	↓	Ø	n.v.	n.v.	n.v.
Plazmafehérje extravazáció	n.v.	n.v.	Ø	Ø	Ø	n.v.	n.v.	n.v.

3. táblázat SzV-1287 hatása WT egerekben TRPV1- és TRPA1-aktiváció indukálta akut fájdalom modell, illetve WT, TRPV1^{-/-} és TRPA1^{-/-} egerekben K/BxN szérum-indukált krónikus ízületi fájdalom modell paramétereire. Jelmagyarázat: ↓: szignifikánsan csökkent az oldószerrel kezelt csoporthoz képest; Ø: nem változott; n.v.: nem vizsgáltuk.

MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

Kísérleteink során elsőként bizonyítottuk a TRPA1 receptor szabályozó szerepét adjuváns-, a TRPV1-et szérum transzfer-indukált krónikus artritiszben. Fontos adatokat szolgáltatunk az újonnan szabadalmaztatott, több támadáspontú SSAO-gátló vegyületünk, az SzV-1287, fájdalomcsillapító hatásairól különböző mechanizmusú krónikus artritisz modellekben, amelyek a gyulladásgátló hatásától (legalábbis részben) függetlennek bizonyultak.

Munkánk első részének célja a kapszaicin-érzékeny érzőideg végződéseken, számos immunsejten és a vaszkulaturában is expresszáldó TRPA1 és TRPV1 receptorok szerepének vizsgálata volt akut és krónikus ízületi gyulladás és fájdalom modellekben. TRPV1 receptor jelentősége a gyulladásban és a fájdalomtranszmisszióban már régóta ismert volt, majd ezek az ismeretek egyre gyorsabban szaporodtak a receptor klónozását és génhiányos egerek előállítását követően (Caterina és mtsai., 2000; Szabó és mtsai., 2005; Bölcskei és mtsai., 2005; Barton és mtsai., 2006; Fernandes és mtsai., 2011). A TRPV1 receptornak köszönhetően egyre nagyobb figyelem hárult a TRP receptorcsalád fiziológias és patológias folyamatokban betöltött szerepére. Így derült fény a TRPA1 lokalizációjára is a nociceptív neuronokon a 2000-es évek első felében, amely felvetette a neurogén gyulladásban és a fájdalomban játszott esetleges mediátor szerepét (Story és mtsai., 2003). Ezt követően egyre több publikáció jelent meg a receptorral kapcsolatban, azonban ezek többsége elsősorban a hidegérzékelésben és akut gyulladásban játszott szerepével foglalkozott (Obata és mtsai., 2005; Katsura és mtsai., 2006; Kwan és mtsai., 2006; Petrus és mtsai., 2007; Eid és mtsai., 2008). Bár 2006-tól a szelektív receptor antagonisták mellett TRPA1^{-/-} egerek is a kutatók rendelkezésére álltak (Bautista és mtsai., 2006), azóta mégis nagyon kevés olyan publikáció jelent meg, amelyekben ezeket az egereket használták volna. Ez különösen igaz a receptor krónikus ízületi gyulladásban és fájdalomban játszott szerepével kapcsolatban, hiszen ezt mindössze három kutatócsoport vizsgálta ezzel az értékes módszerrel.

Az említett kutatócsoportok TRPA1^{-/-} egerekben szignifikánsan kisebb i.a. CFA- és monojóid acetát (MIA)-indukált ízületi fájdalmat detektáltak krónikus artritisz és oszteoartritisz modellekben TRPA1^{+/-} egerekkel összehasonlítva (Fernandes és mtsai., 2011; Moilanen és mtsai., 2015), míg Garrison és Stucky TRPA1 korfüggő szerepét igazolták génhiányos egerek segítségével az i.pl. CFA-indukált mechanikai

hiperalgéziában (Garrison és Stucky, 2014). I.pl. és faroktőbe adott CFA-val kiváltott artritisz modellünkben kapott eredményeink egybecsengenek ezekkel az adatokkal, hiszen TRPA1^{-/-} egerekben mi is szignifikánsan kisebb mechanikai hiperalgéziát találtunk, de emellett ugyanezt a különbséget tapasztaltuk lábduzzadás, szövettani károsodás, korai neutrofil MPO aktivitás és késői plazmafehérje extravazáció tekintetében is. A TRPA1 adjuváns-indukált neutrofil aktivációban és vaszkuláris permeabilitás fokozódásban játszott szabályozó szerepéről elsőként közöltünk adatokat az irodalomban. Előbbi eredményünket azóta egy RA-s betegekben végzett vizsgálat is megerősítette, amelyben a TRPA1 perifériás leukocitákon való expressziója nemcsak a fájdalom és a mozgáskorlátozottság mértékével, hanem a neutrofil granulocita számmal is korrelált (Pereira és mtsai., 2017). Korábban TRPA1 hiperalgéziában játszott szerepét az ízületi gyulladástól függetlennek vélték, hiszen nem találtak szignifikáns különbséget a vad és génhiányos csoportok között térdízületi duzzadás és szövettani elváltozások tekintetében, amely látszólag ellentmond az eredményeinknek. A különbségeket valószínűleg az alkalmazott modellek (i.a. vs. i.pl./faroktőbe adás, térd monoartritisze vs. boka- és láb kisízületeinek gyulladása, eltérő kinetika) és módszerek (digitális mikrométer vs. pletimométer) közötti eltérések okozhatják. A génhiányos egerekkel végzett kísérletek eredményeit egy szelektív TRPA1-blokkolóval végzett kísérlet is megerősíti, hiszen az i.p., i.pl. és intratekális HC-030031 akutan adva 1., 7. és 28. napon is szignifikánsan csökkentette az i.pl. CFA-indukált mechanikai hiperalgéziát (da Costa és mtsai., 2010). A TRPA1^{-/-} egerekkel kapott funkcionális és szövettani eredményeink teljesen megegyeznek a korábban TRPV1^{-/-} egerekkel végzett kísérletünk eredményeivel (Szabó és mtsai., 2005), ami alátámasztja a két receptor interakciójáról szóló adatokat (Akopian és mtsai., 2007; Salas és mtsai., 2009; Patil és mtsai., 2010; Spahn és mtsai., 2014).

CFA-indukált artritisz modellünkben a humán betegséghez hasonlóan nem alakult ki számottevő termális hiperalgézia egyik egértörzsben sem, illetve szignifikáns különbséget sem tapasztaltunk köztük e tekintetben, ami megerősíti azokat a korábbi megfigyeléseket, amely szerint a TRPA1 nem játszik szerepet a fájdalmas hő érzékelésében (Bautista és mtsai., 2006; Kwan és mtsai., 2006; Eid és mtsai., 2008). Ezzel szemben TRPA1 hidegérzékelésben játszott szerepe köztudott (Story és mtsai., 2003; Obata és mtsai., 2005; Katsura és mtsai., 2006; Kwan és mtsai., 2006), a CFA-indukált fokozott hidegérzékenységet is sikerült korábban TRPA1-antagonistával kivédeni (da Costa és mtsai., 2010), azonban a mi kísérleti paradigmánkban nem találtunk különbséget TRPA1^{+/+} és TRPA1^{-/-} csoport között e tekintetben. A hidegtolerancia a gyulladás

súlyosságától függetlenül mindkét törzsben csökkent CFA adását követően, ami alapján azt feltételezhetjük, hogy a fokozott hidegérzékenységet az ismételt mérések okozhatták. Ebből arra következtethetünk, hogy az általunk alkalmazott vizsgálati módszer nem alkalmas a hidegérzékenység vizsgálatára ebben a modellben.

Az aktív immunizációs mechanizmusokat magába foglaló CFA-moddal ellentétben az autoantitesteket és citokineket tartalmazó szérum passzív transzferén alapuló K/BxN-modellben a mechanikai hiperalgéria, a lábduzzadás és a neutrofil MPO aktivitás mértéke is hasonló volt a TRPA1^{+/+} és a TRPA1^{-/-} csoportban. TRPA1-nek mindössze a késői vaszkuláris permeabilitás fokozódás mérséklésében feltételezhetjük részleges szerepét ebben a modellben, mivel 6. nap szignifikánsan nagyobb plazmafehérje kiáramlást tapasztaltunk a TRPA1^{-/-} csoportban. Ezzel szemben TRPV1^{-/-} egerekben szignifikánsan kisebb K/BxN szérum-indukált mechanikai hiperalgériát és plazmafehérje extravazációt, illetve súlyosabb gyulladásos tüneteket tapasztaltunk, míg a ROS termelés mértékét nem befolyásolta a receptor hiánya. Korábban a kapszaicin-érzékeny érzőideg végződésének deszenzibilizációjának hatását vizsgálva ugyanebben a modellben munkacsoportunk ezzel megegyező funkcionális eredményeket kapott, és a deszenzibilizációt követő súlyosabb gyulladásos tüneteket az antiinflammatorikus hatású szomatosztatin csökkent felszabadulásával magyarázta (Borbély és mtsai., 2015).

TRPA1 akut gyulladásban és fájdalomban játszott szerepével kapcsolatban jóval több adat áll rendelkezésünkre. A szelektív receptor antagonisták közül az i.pl. AP-18 és p.o. HC-030031 is szignifikánsan csökkentette a CFA-indukált akut gyulladásos fájdalmat (Petrus és mtsai., 2007; Eid és mtsai., 2008), i.p. és p.o. HC-030031 a formalin- és AITC-indukált elhárító reakciót egérben (McNamara és mtsai., 2007; Eid és mtsai., 2008), i.pl. HC-030031 a karragenin-indukált mechanikai hiperalgériát patkányban (Bonet és mtsai., 2013), illetve az AITC- és karragenin-indukált lábduzzadást egérben (Moilanen és mtsai., 2012). Ezzel szemben a szisztémás és i.a. HC-030031 sem tudta gátolni akután a MIA-indukált oszteoartritiszes fájdalmat (Okun és mtsai., 2012), míg a szisztémásan adott A-960779 bár csökkentette a magas intenzitású mechanikai stimulusok által kiváltott neuronális válaszokat, a spontán idegi aktivitást nem befolyásolta oszteoartritiszes állatokban (McGaraughty és mtsai., 2010). TRPA1 génhiányos egerekben a vad társaikkal ellentétben nem alakult ki mechanikai hiperalgéria i.pl. bradikinin vagy AITC adást követően sem, illetve a fájdalmas hideg expozíóra és mechanikai stimulusokra is kevésbé voltak érzékenyek (Bautista és mtsai., 2006; Kwan és mtsai., 2006). Kizárólag egy közlemény számol be arról, hogy a TRPA1^{-/-} és TRPA1^{+/+} egerek között nem volt

szignifikáns különbség a CFA-indukált akut mechanikai hiperalgéziában (Petrus és mtsai., 2007).

Karragenin-indukált akut gyulladás modellünkben az irodalmi adatokkal ellentétben nem találtunk szignifikáns különbséget a TRPA1 génhíányos és vad egércsoport között sem lábduzzadás, sem mechanikai, sem termális hiperalgéria tekintetében. Más kutatócsoportok ezzel szemben TRPA1 szerepét igazolták szelektív antagonistá (HC-030031) és génhíányos egerek segítségével a karragenin-indukált mechanikai hiperalgéziában, illetve lábduzzadásban (Moilanen és mtsai., 2012; Bonet és mtsai., 2013). A különbségeket valószínűleg a különböző fajok (patkány vs. egér), mérési időpontok és vizsgálati módszerek okozhatják. A fent már említett TRPA1-TRPV1 interakció miatt fontos megjegyezni, hogy korábban ugyanezekkel a módszerekkel TRPV1^{-/-} és WT egerek között sem találtunk különbséget a karragenin-indukált a mechanikai hiperalgéria és lábduzzadás vonatkozásában (Bölcskei és mtsai., 2005). A karragenin-modellhez hasonlóan TRPA1 receptor hiánya, az irodalmi adatokkal összhangban, nem befolyásolta az akut mechanikai hiperalgéria és térdízületi duzzadás kialakulását egyik mérési időpontban sem a 24 órás kísérleti periódus során az i.a. CFA-val indukált gyulladás modellünkben (Petrus és mtsai., 2007; Fernandes és mtsai., 2011). Az általunk alkalmazott négy modellben a TRPA1 funkciójával kapcsolatban kapott eltérő eredményeket a TRPA1 széles szöveti eloszlásával magyarázhatjuk, hiszen nemcsak az érzőidegeken, hanem különböző nem neurális sejteken is expresszálódik (Fernandes és mtsai., 2012). Számos adat bizonyítja, hogy a gyulladás során lokálisan keletkező endogén TRPA1 agonisták különböző módon képesek befolyásolni a receptor működését az érzőideg végződéseken és a nem neurális sejteken, ami a gyulladásos kaskád aktiválását vagy épp gátlását eredményezheti. Például amíg TRPA1 agonista hatására a keratinocitákban fokozott proinflammatorikus citokin expressziót (Atoyan és mtsai., 2009), a tímuszban pedig felgyorsult T-sejt differenciációt tapasztaltak (Koh és mtsai., 1998), addig a makrofágokban csökkent proinflammatorikus citokin termelést figyeltek meg (Chao és mtsai., 2008).

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy eredményeink alapján **TRPA1 és TRPV1 is fontos szabályozó szerepet tölt be krónikus artritisz patomechanizmusában**, ezért ígéretes támadáspontjai lehetnek új hatásmechanizmusú gyulladás- és fájdalomcsillapító szereknek. Eredményeink jelentőségét és potenciális klinikai értékét az is alátámasztja, hogy az értekezés alapjául szolgáló első eredeti közleményünket a Nature Reviews Rheumatology a megjelenés után néhány héttel „highlights”-ként méltatta (Duarte, 2016).

Munkánk második részének célja új hatásmechanizmusú gyulladás- és fájdalomcsillapítók potenciális támadáspontjául szolgáló SSAO vizsgálata volt krónikus ízületi gyulladás és fájdalom egérmódeljeiben. Az SSAO gyulladásban játszott központi szerepe (Smith és mtsai., 1998; Salmi és mtsai., 2001a) és az SSAO-gátló vegyületek gyulladáscsökkentő hatása (Salter-Cid és mtsai., 2005; Wang és mtsai., 2006), többek között ízületi gyulladás modellekben (Marttila-Ichihara és mtsai., 2006), már régóta ismert. Azonban nocicepcióban betöltött esetleges funkciójával és az enzimgátló vegyületek esetleges fájdalomcsillapító hatásával kapcsolatban nem álltak rendelkezésünkre adatok. Ezt kutatócsoportunk vetette fel először *in vitro* eredmények alapján (Payrits és mtsai., 2016), majd a jelen értekezésben is bemutatott *in vivo* kísérleteink során az irodalomban elsőként szolgáltatott adatokat az SSAO-gátlás analgetikus hatásával kapcsolatban.

Kísérleteink középpontjában azonban nemcsak az SSAO-gátlás fájdalomcsillapító hatásának vizsgálata, hanem egy új, komplex hatásmechanizmusú, innovatív SSAO-gátló vegyület tanulmányozása is állt. Az elmúlt másfél évtizedben számos kis molekulájú SSAO-inhibitor fejlesztettek ki gyulladásos betegségek kezelésre, amelyek hatásosnak bizonyultak rágcsáló gyulladás modellekben, azonban klinikai felhasználásukat a legtöbb esetben nem megfelelő szelektivitásuk, kedvezőtlen fizikokémiai tulajdonságaik vagy épp potenciális toxicitásuk korlátozta (Salter-Cid és mtsai., 2005; Wang és mtsai., 2006; Marttila-Ichihara és mtsai., 2006; Foot és mtsai., 2013). Eddig csak egy kis molekulájú inhibitor tudta sikerrel teljesíteni a klinikai fázis I vizsgálatot (PXS-4728A, Pharmaxis, Sydney, Ausztrália), a vegyülethez nagy reményeket fűznek NASH (Jarolimek és Charlton; 2015) és COPD kezelésében is (Jarnicki és mtsai., 2016). Emellett egy humán SSAO-ellenes monoklonális antitest klinikai vizsgálata (BTT-1023, Biotie, Turku, Finnország) zárult le a közelmúltban, amely végén a készítmény „árva” („orphan”) gyógyszer megjelölést kapott az Európai Unióban primér szklerotizáló kolangitisz kezelésére (Botz és mtsai., 2016a). A munkacsoportunk által szabadalmaztatott SSAO-inhibitor, az **SzV-1287** az ismert COX-inhibitor oxaprozin oxim analógja (Mátyus és mtsai., 2010; Helyes és mtsai., 2014). Bár korábban már leírták néhány oxim vegyület SSAO-gátló hatását (Hiraoka és mtsai., 1988; Mlícková és mtsai., 2001), ebből a vegyületcsoportból érdekes módon még egy gyógyszerjelölt sem került klinikai vizsgálatra. SzV-1287 abból a szempontból kiemelkedik az SSAO-gátló vegyületek közül, hogy az SSAO gátlása mellett aktív metabolitja révén COX-gátlásra is képes (Mátyus és Chai, 2015), illetve alap hatásától függetlenül antagonistaként hat az érző

neuronokon és érzőideg végződéseken elhelyezkedő TRPA1 és TRPV1 receptorokon is (Payrits és mtsai., 2016).

Új hatásmechanizmusú vegyületünk a referencia vegyülethez (LJP-1207) hasonlóan két különböző mechanizmusú krónikus artritisz modellben is hatékonynak bizonyult. Mindkét vegyület szignifikánsan csökkentette a K/BxN szérumsz. és CFA-indukált mechanikai hiperalgéziát és lábduzzadást, illetve a K/BxN szérumsz.-indukált korai plazmafehérje extravazációt. K/BxN szérumsz.-indukált artritisz modellben a késői plazmafehérje kiáramlást csak a referencia vegyület csökkentette szignifikánsan, a neutrofil MPO aktivitást egyik vegyület sem befolyásolta, hasonlóan a CFA-indukált neutrofil aktivációhoz és vaszkuláris permeabilitás fokozódáshoz. Az alkalmazott artritisz modellek patomechanizmusában fontos szerepet játszó, öt jellegzetes gyulladásos citokin közül (IL-1 β , IL-6, KC, MIP-2, TNF- α) az SSAO-inhibitorok kizárólag a makrofágok, endotél sejtek, szinoviociták által termelt, neutrofil kemoattraktáns KC (Iida és Grotendorst, 1990; Becker és mtsai., 1994; Chou és mtsai., 2010) szintjét csökkentették szignifikánsan az artritiszes ízületi homogenizátumokban. K/BxN szérumsz.-indukált artritiszben SzV-1287, CFA-modellben LJP-1207 csökkentette szignifikánsan az említett citokin szintjét. Ebből arra következtethetünk, hogy az SSAO-gátlók gyulladás- és fájdalomcsillapító hatása nem elsősorban a citokin termelés gátlásából fakad.

Az SSAO-gátlással elérhető gyulladáscsökkentés vonatkozásában eredményeink összhangban vannak az irodalmi adatokkal, hiszen korábban az LJP-1207-hez hasonlóan hidrazinok közé tartozó BTT-2025 i.p. és p.o. adását, illetve az SSAO génjének kiütését követően is szignifikánsan kisebb klinikai és szövettani gyulladásos paramétereket detektáltak egy aktív (adjuváns-indukált) és egy passzív (II-es típusú kollagén-ellenes antitest-indukált) immunizációs artritisz modellben (Mattila-Ichihara és mtsai., 2006). Emellett pedig Szv-1287 gyulladáscsökkentő hatását is igazolták már i.p. karragenin- és CFA-indukált gyulladás modellekben (Tábi és mtsai., 2013). Azonban az említett kísérletekben a vegyületek esetleges fájdalomcsillapító hatását nem vizsgálták, ezzel kapcsolatban munkacsoportunk szolgáltatta az első adatokat. Bár SzV-1287 és a referencia vegyület LJP-1207 adását követően hasonló mértékű, szignifikánsan kisebb mechanikai fájdalomküszöb csökkenést és lábduzzadást figyeltünk meg az oldószerszel kezelt csoporthoz képest, a szövettani károsodás vonatkozásában jelentős különbséget tapasztaltunk. Míg SzV-1287 szignifikánsan csökkentette a szövettani elváltozások közül a szinoviális mononukleáris sejtinfiltráció és a porckárosodás mértékét, addig a krónikus LJP-1207 kezelés jelentős porcdestrukciót eredményezett. *In vivo* megfigyelésünket *in*

vitro is sikerült megerősíteni, hiszen a két vegyület közül csak LJP-1207 csökkentette szignifikánsan a metakromáziásan festődő porcmátrix mennyiségét kondrocita sejt kultúrában. LJP-1207 porckárosító hatása valószínűleg nem az SSAO-gátló hatás következménye, mivel egy másik munkacsoport nem olyan régen SSAO-gátló alkalmazása mellett a kondrocita differenciáció késleltetését tapasztalta a porcsejtek életképességének befolyásolása nélkül *in vitro* (Filip és mtsai., 2016). Az említett nem kívánt hatás hátterében elképzelhető, hogy az alkalmazott vegyületek eltérő kémiai szerkezete áll. Emellett nem zárhatjuk ki, hogy SzV-1287 esetén az *in vitro* megfigyelt TRPV1/TRPA1 antagonistá hatása áll a kisebb mértékű porckárosodás hátterében, hiszen egy szintén nemrég közölt publikációban TRPA1 hiánya protektív tényezőnek bizonyult MIA-indukált porckárosodásban (Moilanen és mtsai., 2015).

SzV-1287 és LJP-1207 gyulladásgátló hatása az irodalomból már jól ismert, leukocita transzmigráció gátló hatással magyarázható (Salmi és mtsai., 2001; Tokha és mtsai., 2001; Lalor és mtsai., 2002; Bonder és mtsai., 2005), míg fájdalomcsillapító hatásuk valószínűleg nemcsak az érzőideg végződés perifériás szenzitizációjának, hanem a fájdalom-pálya centrális szenzitizációs mechanizmusainak gátlásából is fakad. Utóbbi hipotézist támaszthatják alá azok az adatok, amelyek nemcsak az egér agyi kapillárisok endotél sejtjein (Unzeta és mtsai., 2007), hanem az eddigi eredményekkel ellentétben a neuronokon is igazoltak SSAO aktivitást (Qiang és mtsai., 2014).

LJP-1207 korábban számos gyulladásos modellben (pl. kolitisz, szklerózis multiplex, LPS-indukált endotoxémia, stroke) hatékonynak bizonyult (Salter-Cid és mtsai., 2005; Xu és mtsai., 2006), illetve krónikus *in vivo* kísérleteink során mi sem tapasztaltunk szignifikáns különbséget LJP-1207 és SzV-1287 gyulladás- és fájdalomcsillapító hatása között. Ennek ellenére a vegyület allilhidrazin derivátum révén nem alkalmas gyógyszerfejlesztésre, hiszen ahogy mi is igazoltuk, krónikus alkalmazás során súlyos nem kívánt hatásokat is okozhat (Foot és mtsai., 2013).

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy **elsőként szolgáltatunk adatokat az SSAO-gátlás fájdalomcsillapító hatásáról, illetve új, komplex hatásmechanizmusú SSAO-gátló vegyületünk, SzV-1287 artritiszes tüneteket csökkentő és porc-védő hatásáról.** Utóbbi eredmények alapján SzV-1287 ígéretes vegyület lehet gyógyszerfejlesztés szempontjából.

Munkánk harmadik részének célja TRPV1 és TRPA1 receptorok funkciójának tisztázása volt *in vivo* SzV-1287 hatásmechanizmusában. Korábban munkacsoportunk vetette fel először a gyulladásban és a fájdalom közvetítésében is fontos TRPA1 és az

endogén agonistáit is termelő SSAO lehetséges kapcsolatát, majd *in vitro* igazolta újonnan szabadalmaztatott SSAO-gátló vegyületünk, SzV-1287 közvetlen TRPA1 és TRPV1 antagonistá hatását érző neuronokon és idegvégződéseken is (Payrits és mtsai., 2016). In vivo először szelektív TRPV1 agonista RTX- és TRPA1 agonista formalin-indukált akut kemonocifenzív és hiperalgémia modellekben vizsgáltuk SzV-1287 hatását. SzV-1287 szignifikánsan csökkentette a gyorsan kialakuló, TRPV1 és TRPA1 aktiváció-indukált akut termális hiperalgémia és elhárító reakciót, illetve a lassan kialakuló mechanikai hiperalgémia is, míg a referencia vegyület LJP-1207 csak a centrális szenzitizációs mechanizmusoknak köszönhető mechanikai hiperalgémia csökkentette mindkét modellben. Ebből arra következtethetünk, hogy a vegyületek mechanikai hiperalgémia csökkentő hatását az SSAO gátlás eredményezheti, míg SzV-1287 direkt TRPV1/TRPA1 blokkoló hatásának az érzőideg végződések gyors perifériás szenzitizációjának gátlásában lehet szerepe.

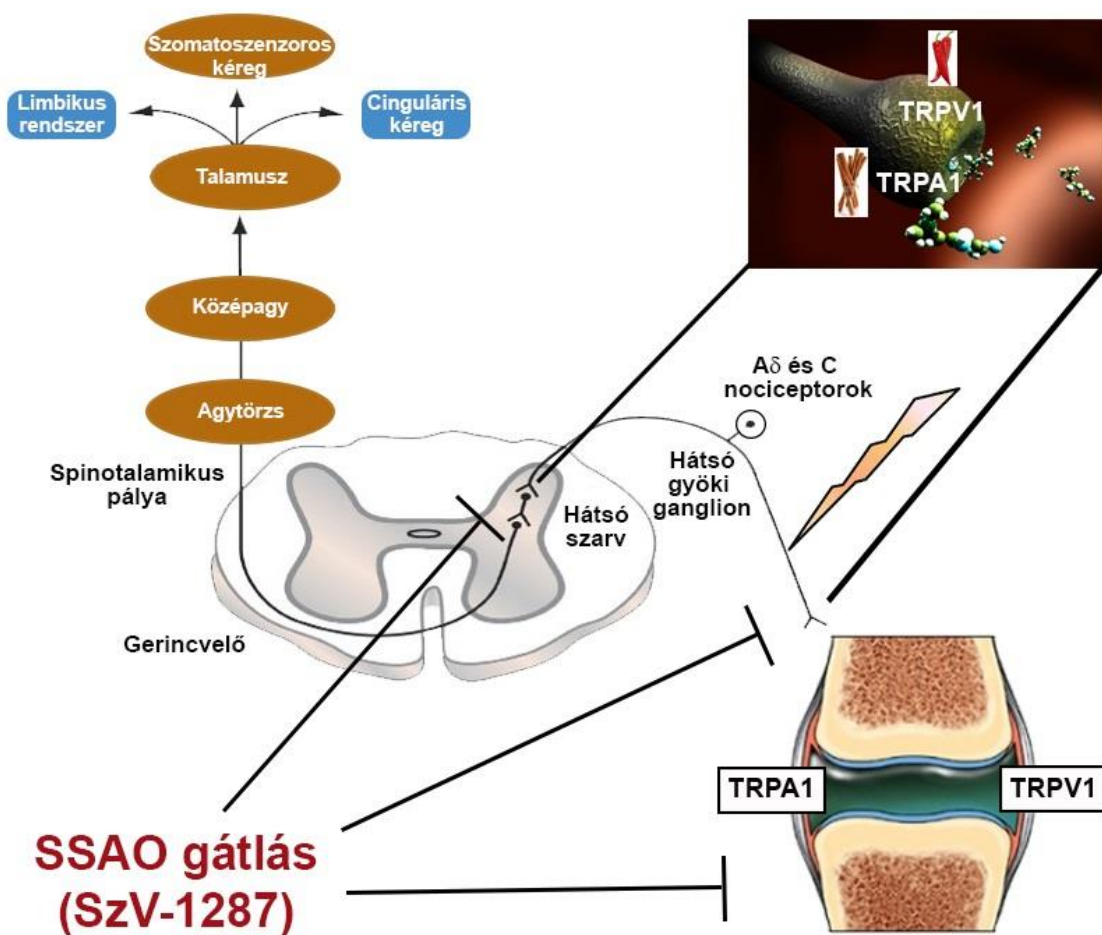
A továbbiakban a már korábban ismertetett, immun-mediált K/BxN szérum-indukált artritisz és traumás mononeuropátia modellben vizsgáltuk TRPV1 és TRPA1 szerepét SzV-1287 hatásmechanizmusában génihiányos egerek segítségével. A korábbi kísérletekkel ellentétben az autoimmun artritisz kiváltását nem egyszeri, hanem ismételt K/BxN szérum injekcióval váltottuk ki. Erre azért volt szükség, hogy a betegség fennállását elnyújtsuk, és vizsgálni tudjuk SzV-1287 fájdalomcsillapító hatásának egy másik aspektusát. A modell jellegzetessége ugyanis, hogy a humán betegséghez hasonlóan a gyulladásos fázis lezajlása után (kb. 10-14 nap) centrális mechanizmusoknak köszönhetően a fájdalom perzisztál. Ismételt szérum adás után ez a neuropátiás komponenssel rendelkező fájdalom még kifejezettebbé válik (Christianson és mtsai., 2010). Mivel SzV-1287 TRPV1^{-/-} egerekben nem csökkentette a K/BxN szérum-indukált krónikus mechanikai hiperalgémia, TRPA1^{-/-} és TRPV1^{-/-} egerekben az ödémát, TRPA1^{-/-} egerekben pedig a neutrofil MPO aktivitást, ezért ebből arra következtethetünk, hogy SzV-1287 antihiperalgémia hatása valószínűleg TRPV1, ödémagátló hatása TRPV1- és TRPA1, míg neutrofil aktiváció gátló hatása TRPA1-függő folyamat.

A tisztán neuropátiás mechanizmusú traumás idegkárosodás modellben szintén igazoltuk SzV-1287 fájdalomcsillapító hatását, ugyanis 20 mg/kg dózisban egyszeri adást követően kb. 65%-os fájdalomküszöb csökkenést eredményezett az oldószerrel kezelt vad típusú csoporthoz képest. A 7 napos ismételt adagolás esetén sem fokozódott a vegyület hatása, ami arra utal, hogy vegyületünk akut fájdalomcsillapító hatással rendelkezik, és nem befolyásolja a neuropátia kialakulását. SzV-1287 sem TRPV1^{-/-}, sem TRPA1^{-/-} csoportban nem csökkentette a neuropátiás mechanikai hiperalgémia, ami arra utalhat,

hogy SzV-1287 antihiperalgéziás hatását mindkét, érzőideg végződésen funkcionális egységet képező receptor közvetíti (Akopian és mtsai., 2007; Salas és mtsai., 2009; Patil és mtsai., 2010; Spahn és mtsai., 2014).

A CFA- és K/BxN szérum-indukált artritisz modellekhez hasonlóan sem traumás mononeuropátia, sem akut kemonocifenzív modellekben nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget LJP-1207 és SzV-1287 antihiperalgéziás hatása között. Ez ugyancsak alátámasztja a korábbi hipotézisünket, mely szerint SzV-1287 analgetikus hatásában az SSAO gátlása játssza a kulcsszerepet. Mint ahogy korábban említettem, SzV-1287 SSAO-gátló és TRPV1/TRPA1-blokkoló hatása mellett aktív metabolitja révén COX-gátló hatással is rendelkezik (Mátyus és Chai, 2015), ezért megvizsgáltuk, ez a hatása szerepet játszhat-e analgetikus hatásában. Traumás mononeuropátia modellben azonban sem diklofenák, sem az aktív metabolit oxaprozin nem csökkentette a mechanikai hiperalgéziát, amely egyben megerősíti az NSAID-ok neuropátiás fájdalomban tapasztalt hatástalanságát (Botz és mtsai., 2016a). Természetesen ettől függetlenül más gyulladás modellekben nem zárhatjuk ki a COX-gátló hatás szerepét SzV-1287 hatásmechanizmusában.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy **SzV-1287 potens fájdalomcsillapító hatással rendelkezik neuropátiás mechanizmusú, krónikus fájdalom modellekben is, amely TRPV1-mediált immun-mediált artritiszben, míg TRPV1/TRPA1-mediált traumás mononeuropátiában (51. ábra)**. Eredményeink kiváló alapot szolgáltattak egy új gyógyszerjelölt preklinikai fejlesztésének elindításához, amelyet az „Új, több támadáspontú innovatív fájdalomcsillapító fejlesztése: hatástani, preklinikai és humán fázis I. vizsgálatok” című GINOP-2.2.1-15-2016-00020 pályázat keretén belül kívánunk megvalósítani. A preklinikai dosszié lezárása 2019 végére várható, majd ezt követően indulhatnak a humán fázis I vizsgálatok, amelynek befejezését 2020-ra tervezzük. Reményeink szerint SzV-1287 a jövőben áttörést hozhat az idegi eredetű (neuropátiás) fájdalomállapotok kezelésben.



51. ábra Az SSAO-gátlók potenciális analgetikus mechanizmusa. Rövidítések: SSAO: szemikarbazid-szenzitív amin oxidáz, TRPA1: tranziens receptor potenciál ankyrin 1, TRPV1: tranziens receptor potenciál vanilloid 1.

IRODALOMJEGYZÉK

- Aalto K**, Maksimow M, Juonala M, Viikari J, Julia A, és mtsai. Soluble vascular adhesion protein-1 correlates with cardiovascular risk factors and early atherosclerotic manifestations. *Arterioscler Throm Vasc Biol* 2012;32:523-32.
- Airas L**, Mikkola J, Vainio JM, Elovaara I, Smith DJ. Elevated serum soluble vascular adhesion protein-1 (VAP-1) in patients with active relapsing remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2006;177:132-5.
- Akopian AN**, Ruparel NB, Jeske NA, Hargreaves KM. Transient receptor potential TRPA1 channel desensitization in sensory neurons is agonist dependent and regulated by TRPV1-directed internalization. *J Physiol* 2007;583:175-93.
- Alamanos Y**, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2005;4:130-6.
- Alamanos Y**, Voulgari PV, Drosos AA. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum* 2006;36:182-8.
- Almási R**, Pethő G, Bölcskei K, Szolcsányi J. Effect of resiniferatoxin on the noxious heat threshold temperature in the rat: a novel heat allodynia model sensitive to analgesics. *Br J Pharmacol* 2003;139:49-58.
- Amadesi S**, Nie J, Vergnolle N, Cottrell GS, Grady EF, és mtsai. Protease-activated receptor 2 sensitizes the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid receptor 1 to induce hyperalgesia. *J Neurosci* 2004;24:4300-12.
- Anand P**, Bley K. Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanism of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. *Br J Anaesth* 2011;107:490-502.
- Andrés N**, Lizcano JM, Rodríguez MJ, Romera M, Unzeta M, Mahy N. Tissue activity and cellular localization of human semicarbazide-sensitive amine oxidase. *J Histochem Cytochem* 2001;49:209-17.
- Arendt-Nielsen L**, Harris S, Whiteside GT, Hummel M, Knappenberger T, és mtsai. A randomized, double-blind, positive-controlled, 3-way cross-over human experimental pain study of a TRPV1 antagonist (V116517) in healthy volunteers and comparison with preclinical profile. *Pain* 2016;157:2057-67.
- Aronson JK**. Meyler's side effects of analgesics and anti-inflammatory drugs. Amsterdam: Elsevier; 2009.

Atoyan R, Shander D, Botchkareva NV. Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin. *J Invest Dermatol* 2009;129:2312-15.

Attal N, Cruccu G, Baron R, Haanpää M, Hansson P, és mtsai. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *Eur J Neurol* 2010;17:1113-23.

Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, és mtsai. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron*. 2004;41:849-57.

Barton NJ, McQueen DS, Thompson D, Gauldie SD, Wilson AW, és mtsai. Attenuation of experimental arthritis in TRPV1R knockout mice. *Exp Mol Pathol* 2006;81:166-70.

Bautista DM, Movahed P, Hinman A, Axelsson HE, Sterner O, és mtsai. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:12248-52.

Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Pamela R, Tsuruda PR, és mtsai. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 2006;124:1269–82.

Bánki E, Degrell P, Kiss P, Kovács K, Kemény Á, és mtsai. Effect of PACAP treatment on kidney morphology and cytokine expression in rat diabetic nephropathy. *Peptides* 2013;42:125-30.

Becker S, Quay J, Koren HS, Haskill JS. Constitutive and stimulated MCP-1, GRO alpha, beta, and gamma expression in human airway epithelium and bronchoalveolar macrophages. *Am J Physiol* 1994;266:L278-86.

Bennett MI, Attal N, Backonja MM, Baron R, Bouhassira D, és mtsai. Using screening tools to identify neuropathic pain. *Pain* 2007;127:199-203.

Bertin S, Aoki-Nonaka Y, Lee J, de Jong PR, Kim P, és mtsai. The TRPA1 ion channel is expressed in CD4+ T cells and restrains T-cell-mediated colitis through inhibition of TRPV1. *Gut* 2016;doi: 10.1136/gutjnl-2015-3100710.

Bevaart L, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum* 2010;62:2192-205.

Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol* 2001;70:849-60.

Binstadt BA, Patel PR, Alencar H, Nigrovic PA, Lee DM, és mtsai. Particularities of the vasculature can promote the organ specificity of autoimmune attack. *Nat Immunol* 2006;7:284-92.

Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 2000;12:64-76.

Bonder CS, Norman MU, Swain MG, Zbytnuik LD, Yamanouchi J, és mtsai. Roles of recruitment for Th1 and Th2 lymphocytes in inflamed liver: a role for alpha-4 integrin and vascular adhesion protein-1. *Immunity* 2005;23:153-63.

Bonet IJM, Fischer L, Parada CA, Tambeli CH. The role of transient receptor potential A 1 (TRPA1) in the development and maintenance of carrageenan-induced hyperalgesia. *Neuropharmacology* 2013;65:206-12.

Boomsma F, van den Meiracker AH, Winke S, Aanstoot HJ, Batstra MR, és mtsai. Circulating semicarbazide-sensitive amine oxidase is raised both in type I (insulin-dependent), in type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and even in childhood type I diabetes at first clinical diagnosis. *Diabetologia* 1999;42:233-7.

Boomsma F, de Kam PJ, Tjeerdsma G, van den Meiracker AH, van Veldhuisen DJ. Plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) is an independent prognostic marker for mortality in chronic heart failure. *Eur Heart J* 2002;21:1859-63.

Borbély É, Botz B, Bölcskei K, Kenyér T, Kereskai L, és mtsai. Capsaicin-sensitive sensory nerves exert complex regulatory functions in the serum-transfer mouse model of autoimmune arthritis. *Brain Behav Immun* 2015;45:50-9.

Borbély É, Sándor K, Markovics A, Kemény Á, Pintér E, és mtsai. Role of capsaicin-sensitive nerves and tachykinins in mast cell tryptase-induced inflammation of murine knees. *Inflamm Res* 2016;65:725-36.

Botz B, Bölcskei K, Kereskai L, Kovács M, Németh T, és mtsai. Differential regulatory role of Pituitary Adenylate-Cyclase Activating Polypeptide in the serum-transfer-induced arthritis model. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:2739-50.

Botz B, Bölcskei K, Kemény Á, Sándor Z, Tékus V, és mtsai. Hydrophobic cyanine dye-doped micelles for optical in vivo imaging of plasma leakage and vascular disruption. *Biomed Opt* 2015;20:016022.

Botz B, Bölcskei K, Helyes Z. Challenges to develop novel anti-inflammatory and analgesic drugs. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2016a;doi: 10.1002/wnan.1427.

Botz B, Kemény Á, Brunner SM, Locker F, Csepregi J, és mtsai. Lack of galanin 3 receptor aggravates murine autoimmune arthritis. *J Mol Neurosci* 2016b;59:260-9.

Bouhassira D, Lantéri-Minet M, Attal N, Laurent B, Touboul C. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain* 2008;136:380-7.

Bour S, Daviaud D, Gres S, Lefort C, Prévot D, és mtsai. Adipogenesis-related increase of semicarbazide-sensitive amine oxidase and monoamine oxidase in human adipocytes. *Biochemie* 207;89:916-25.

Bozic CR, Lu B, Höpken UE, Gerard C, Gerard NP. Neurogenic amplification of immune complex inflammation. *Science* 1996;273:1722-25.

Brogden KA, Guthmiller JM, Salzet M, Zasloff M. The nervous system and innate immunity: the neuropeptide connection. *Nat Immunol* 2005;6:558-64.

Bölcskei K, Helyes Z, Szabó Á, Sándor K, Elekes K, és mtsai. Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain* 2005;117:368-76.

Bradley JR, Johnson DR, Pober JS. Endothelial activation by hydrogen peroxide. Selective increases of intracellular adhesion molecule-1 and major histocompatibility complex class I. *Am J Pathol.* 1993;142:1598-609.

Burmester GR, Feist E, Dörner T. Emerging cell and cytokine targets in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2014;10:77-88.

Campbell JN, Meyer RA. Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron* 2006;52:77-92.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997;389:816-24.

Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, és mtsai. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 2000;288:306-13.

Chao LK, Hua KF, Hsu HY, Cheng SS, Lin IF, és mtsai. Cinnamaldehyde inhibits pro-inflammatory cytokines secretion from monocytes/macrophages through suppression of intracellular signaling. *Food Chem Toxicol* 2008;46:220-31.

Chen J, Hackos DH. TRPA1 as a drug target-promise and challenges. *Naunyn-Schmiedberg Arch Pharmacol* 2015;388:451-63.

Chiche D, Brown W, Walker P. NEO6860, a novel modality selective TRPV1 antagonist: results from a phase 1, double-blind, placebo-controlled study in healthy subjects. *J Pain* 2016;17:S79.

Chou RC, Kim ND, Sadik CD, Seung E, Lan Y, és mtsai. Lipid-cytokine-chemokine cascade drives neutrophil recruitment in a murine model of inflammatory arthritis. *Immunity* 2010;33:266-78.

Christianson CA, Corr M, Firestein GS, Mobargha A, Ykash TL, Svensson CI. Characterization of the acute and persistent pain state present in K/BxN serum transfer arthritis. *Pain* 2010;151:394-403.

Chu CJ, Huang SM, De Petrocellis L, Bisogno T, Ewing SA, és mtsai. N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that procuces hyperalgesia. *J Biol Chem* 2003;278:13633-9.

Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, és mtsai. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature* 2001;411:957–62.

Coutinho AE, Chapman KE. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Mol Cell Endocrinol* 2011;335:2-13.

Cunha TM, Verri Jr. WA, Schivo IR, Napimoga MH, Parada CA, és mtsai. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *J Leukoc Biol* 2008;83:824-32.

da Costa DSM, Meotti FC, Andrade EL, Leal PC, Motta EM, Calixto JB. The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. *Pain* 2010;148:431–7.

Ditzel HJ. The K/BxN mouse: a model of human inflammatory arthritis. *Trends Mol Med* 2014;10:40-45.

Doherty EM, Fotsch C, Bo Y, Chakrabarti PP, Chen N, és mtsai. Discovery of potent, orally available vanilloid receptor 1 antagonist. Structure-activity relationship of *N*-aryl cinnamides. *J Med Chem* 2005;48:71-90.

Duarte JH. Experimental arthritis: A chilling link to joint pain and hypersensitivity. *Nat Rev Rheumatol* 2016;12:134.

Dworkin RH, O'Connor AB, Backonja M, Farrar JT, Finnerup NB, és mtsai. Pharmacologic management of neurophatic pain: evidence-based recommandations. *Pain* 2007;132:237-51.

Earley S, Gonzales AL, Crnich R. Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by TRPA1 and Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Circ Res* 2009;104:987-94.

Earley S. TRPA1 channels in the vasculature. *Br J Pharamcol* 2012;167:13-22.

Eberhardt MJ, Filipovic MR, Leffler A, de la Roche J, Kistner K, és mtsai. Methylglyoxal activates nociceptors through transient receptor potential channel A1 (TRPA1): a possible mechanism of metabolic neuropathies. *J Biol Chem* 2012;287:28291-306.

Eid SR, Crown ED, Moore EL, Liang HA, Choong KC, és mtsai. HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. *Mol Pain* 2008;4:48.

El Hadri K, Moldes M, Mercier N, Andreani M, Pairsault J, Fève B. Semicarbazide-sensitive amine oxidase in vascular smooth muscle cells: differentiation-dependent expression and role in glucose uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:89-94.

El Kouhen R, Surowy CS, Bianchi BR, Neelands TR, McDonald HA, és mtsai. A-425619 [1-isoquinolin-5-yl-3-(4-trifluoromethyl-benzyl)-urea], a novel and selective transient receptor potential type V1 receptor antagonist, blocks channel activation by vanilloids, heat, and acid. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;314:400–9.

Elliott J, Callingham BA, Sharman DF. The influence of amine metabolizing enzymes on the pharmacology of tyramine in the isolated perfused mesenteric arterial bed of rat. *Br J Pharmacol* 1989;98:515-22.

Enrique-Tarancon G, Marti L, Morin N, Lizcano JM, Unzeta M, és mtsai. Role of semicarbazide-sensitive amine oxidase on glucose transport and GLUT4 recruitment to the cell surface in adipose cells. *J Biol Chem* 1998;273:8025-32.

Fernandes ES, Russell FA, Spina D, McDougall JJ, Graepel R, és mtsai. A distinct role for transient receptor potential ankyrin 1, in addition to transient receptor potential vanilloid 1, in tumor necrosis factor α -induced inflammatory hyperalgesia and Freund' complete adjuvant-induced monoarthritis. *Arthritis Rheum* 2011;63:819–29.

Fernandes ES, Fernandes MA, Keeble JE. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. *Br J Pharmacol* 2012;166:510-21.

Filip A, Pinzano A, Bianchi A, Fève B, Jalkanen S, és mtsai. Expression of the semicarbazide-sensitive amine oxidase in articular cartilage: its role in terminal differentiation of chondrocytes in rat and human. *Osteoarthritis Cartilage* 2016;24:1223-34.

Furst DE, Emery P. Rheumatoid arthritis pathophysiology: update on emerging cytokine and cytokine-associated cell targets. *Rheumatology (Oxford)* 2014;53:1560-9.

Garami A, Shimansky YP, Pakai E, Oliveira DL, Gavva NR, Romanovsky AA. Contributions of different modes of TRPV1 activation to TRPV1 antagonist-induced hyperthermia. *J Neurosci* 2010;30:1435-40.

Garpenstrand H, Ekblom J, Bäcklund LB, Orelund L, Rosenqvist U. Elevated plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) activity in type 2 diabetes mellitus complicated by retinopathy. *Diab Med* 1999;16:514-21.

Garrison SR, Stucky CL. Contribution of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 to chronic pain in aged mice with Complete Freund's Adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2014;66:2380-90.

Gavva NR, Tamir R, Qu Y, Klionsky L, Zhang TJ, és mtsai. AMG9810, (E)-3-(4-*t*-butylphenyl)-*N*-(2,3-dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxin-6-yl)acrylamide, a novel vanilloid receptor 1 (TRPV1) antagonist with antihyperalgesic properties. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;313:474-84.

Gavva NR, Bannan AW, Surapaneni S, Hovland DN Jr, Lehto SG, és mtsai. The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation. *J Neurosci* 2007a;27:3366-74.

Gavva NR, Bannan AW, Hovland DN Jr, Lehto SG, Klionsky L, és mtsai. Repeated administration of vanilloid receptor TRPV1 antagonists attenuates hyperthermia elicited by TRPV1 blockade. *J Pharmacol* 2007b;323:128-37.

Ghilardi JR, Rohrich H, Lindsay TH, Sevcik MA, Schwei MJ, és mtsai. Selective blockade of the capsaicin receptor TRPV1 attenuates bone cancer pain. *J Neurosci* 2005;25:3126-31.

Gibovsky A. Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am J Manag Care* 2012;18:S295-302.

Gilligan JP, Lovato SJ, Erion MD, Jeng AZ. Modulation of carrageenan-induced hind paw edema by substance P. *Inflammation* 1994;18:285-92.

Gomtsyan A, Brederson JD. Clinical and preclinical experience with TRPV1 antagonists as a potential analgesic agents. In: *TRP Channels as Therapeutic Targets*. Amsterdam, The Netherlands: Academic Press/Elsevier; 2015. pp. 129-144.

Gouda AM, Ali HI, Almalki WH, Azim MA, Abourehab MA, Abdelazeem AH. Design, synthesis and biological evaluation of some novel pyrrolizine derivatives as COX inhibitors with anti-inflammatory/analgesic activities and low ulcerogenic liability. *Molecules* 2016;21. pii: E201. doi: 10.3390/molecules21020201.

Gross S, Gammon ST, Moss BL, Rauch D, Harding J, és mtsai. Bioluminescence imaging of myeloperoxidase activity in vivo. *Nat Med* 2009;15:455-61.

Gunthorpe MJ, Benham CD, Randall A, Davis JB. The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:183-91.

Hamilton NB, Kolodziejczyk K, Kougioumtzidou E, Attwell D. Proton-gated Ca^{2+} -permeable TRP channels damage myelin in conditions mimicking ischaemia. *Nature* 2016;529:523-27.

Hayes P, Meadows HJ, Gunthorpe MJ, Harries MH, Duckworth DM, és mtsai. Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain* 2000;88:205-15.

Helyes Zs, Thán M, Oroszi G, Pintér E, Németh J, és mtsai. Anti-nociceptive effect induced by somatostatin released from sensory nerve terminals and by synthetic somatostatin analogues in the rat. *Neurosci Lett* 2000;278:185-8.

Helyes Zs, Szabó A, Németh J, Jakab B, Pintér E, és mtsai. Antiinflammatory and analgesic effects of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in a Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model in the rat. *Arthritis Rheumatol* 2004;50:1677-85.

Helyes Zs, Pintér E, Szolcsányi J. Regulatory role of sensory neuropeptides in inflammation. In: Kovács M, Merchenthaler I, editors. *Neuropeptides and peptide analogs*. Kerala, India: Research Signpost; 2009. pp. 111-141.

Helyes Z, Sándor K, Borbély É, Tékus V, Pintér E, és mtsai. Involvement of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in protease-activated receptor-2-induced joint inflammation and nociception. *Eur J Pain* 2010;14:351-8.

Helyes Z, Mátyus P, Tékus V, Scheich B. Semicarbazide-sensitive amine-oxidase inhibitors, as analgesics in traumatic neuropathy and neurogenic inflammation. 2014; Hungarian and USA PCT P1400205.

Hernandez-Guillamon M, Garcia-Bonilla L, Solé M, Sosti V, Parés M, és mtsai. Plasma VAP-1/SSAO activity predicts intracranial hemorrhages and adverse neurological outcome after tissue plasminogen activator treatment in stroke. *Stroke* 2010;41:1528-35.

Hiraoke A, Ohtaka J, Koike S, Tsuboi Y, Tsuchikawa S, Miura I. Inhibition of copper-containing amine oxidase by oximes. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1988;36:3027-31.

Holzer P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev* 1991;43: 143-201.

Honore P, Wismer CT, Mikusa JP, Zhu CZ, Zhong C, és mtsai. A-425619, a novel TRPV1 receptor antagonist, relieves pathophysiological pain associated with inflammation and tissue injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;314:410-21.

Hood VC, Cruwys SC, Urban L, Kidd BL. The neurogenic contribution to synovial leucocyte infiltration and other outcome measures in a guinea pig model of arthritis. 2001;299:201-4.

Hori T. Capsaicin and central control of thermoregulation. *Pharmacol Ther* 1984;26:389–416.

Hőgyes E. Beitrage zur physiologischen Wirkung der Bestandteile des Capsicum anuum. Arch Exp Pathol Pharmacol 1878;9:117-130.

Hu H, Bandell M, Petrus MJ, Zhu MX, Patapoutian A. Zinc activates damage-sensing TRPA1 ion channels. Nat Chem Biol 2009;5:183-90.

Iida N, Grotendorst GR. Cloning and sequencing of a new *gro* transcript from activated human monocytes: expression in leukocytes and wound tissue. Mol Cell Biol 1990;10:5596-9.

Jakus Z, Simon E, Frommhold D, Sperandio M, Mócsai A. Critical role of phospholipase Cy2 in integrin and Fc receptor-mediated neutrophil functions and the effector phase of autoimmune arthritis. J Exp Med 2009;206:577-93.

Jancsó M. Role of nerve terminals in the mechanism of inflammatory reactions. Bull. Milliard Fillmore Hosp. Buffalo N.Y. 1960;7:53-77.

Jancsó M, Jancsó-Gábor A, Szolcsányi J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. Br J Pharmacol Chemother 1967;31:138-51.

Jarnicki AG, Schiller H, Liu G, Wheeldon K, Essilfie AT, és mtsai. A novel SSAO inhibitor PXS-4728A suppresses inflammation and fibrosis and improves lung function in experimental chronic obstructive pulmonary disease. Br J Pharmacol 2016;doi: 10.1111/bph.13573.

Jarolimek W, Charlton B. Phase 1 results from PXS-4728A, a selective SSAO/VAP-1 inhibitor, for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis. J Hepatol 2015;62:S274-75.

Jensen TS., Baron R, Haanpää M, Kalso E, Loeser JD, és mtsai. A new definition of neuropathic pain. Pain 2011;152:2204-5.

Joe B, Wilder RL. Animal models of rheumatoid arthritis. Mol Med Today 1999;5:367-9.

Johnston B, Kanwar S, Kubes P. Hydrogen peroxide induces leukocyte rolling: modulation by endogenous antioxidant mechanism including NO. Am J Physiol 1996;271:H614-621.

Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, és mtsai. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. Nature 2004;427:260-5.

Juhász T, Matta C, Somogyi C, Katona É, Takács R, és mtsai. Mechanical loading stimulates chondrogenesis via the PKA/CREB-Sox9 and PP2A pathways in chicken micromass cultures. Cell Signal 2014;26:468-82.

Karádi I, Mészáros Z, Csányi A, Szombathy T, Hosszúfalusi N, és mtsai. Serum semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) activity is an independent marker of carotid atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2002;323:139-46.

Kark T, Bagi Z, Lizanecz E, Pásztor ET, Erdei N, és mtsai. Tissue-specific regulation of microvascular diameter: opposite functional roles of neuronal and smooth muscle located vanilloid receptor-1. *Mol Pharmacol* 2008;73:1405-12.

Katsura H, Obata K, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, és mtsai. Antisense knock down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats. *Exp Neurol* 2006;200:112-23.

Keeble J, Blades M, Pitzalis C, Castro da Rocha FA, Brain SD. The role of substance P in microvascular responses in murine joint inflammation. *Br J Pharmacol* 2005;144:1059-66.

Kemik O, Sümer A, Kemik AS, Itik V, Dulger AC, és mtsai. Human vascular adhesion protein-1 (VAP-1): serum levels for hepatocellular carcinoma in non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease. *World J Surg Oncol* 2010;8:83.

Kochukov MY, McNearney TA, Fu Y, Westlund KN. Thermosensitive TRP ion channels mediate cytosolic calcium response in human synoviocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;291:C424-C432.

Koh WS, Yoon SY, Kwon BM, Jeong TC, Nam KS, Han MY. Cinnamaldehyde inhibits lymphocyte proliferation and modulates T-cell differentiation. *Int J Immunopharmacol* 1998;20:643-60.

Komoly S, Palkovits M. Gyakorlati neurológia és neuroanatómia. Medicina, Budapest, 2010.

Korganov AS, Ji H, Mangialaio S, Duchatelle V, Pelanda R, és mtsai. From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity* 1999;10:451-61.

Kouskoff V, Korganow AS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D. Organspecific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* 1996;87:811-22.

Kurkijärvi R, Adams, DH, Leino R, Möttönen T, Jalkanen S, Salmi M. Circulating form of human vascular adhesion protein-1 (VAP-1): increased serum levels in inflammatory liver diseases. *J Immunol* 1998;161:1549-57.

Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, Christensen AP, Zhang DS, és mtsai. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron*. 2006;50:277–89.

Lalor PF, Edwards S, McNab G, Salmi M, Jalkanen S, Adams DH. Vascular Adhesion Protein-1 mediates adhesion and transmigration of lymphocytes on human hepatic endothelial cells. *J Immunol* 2002;169:983-92.

Lalor PF, Sun PJ, Weston CJ, Martin-Santos A, Wakelam MJ, Adams DH. Activation of vascular adhesion protein-1 on liver endothelium results in an NF-kappaB-dependent increase in lymphocyte adhesion. *Hepatology* 2007;45:465-74.

Langford SD, Trent MB, Balakumaran A, Boor PJ. Developmental vasculotoxicity associated with inhibition of semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;155:237-44.

Levine JD, Moskowitz MA, Basbaum AI. The contribution of neurogenic inflammation in experimental arthritis. *J Immunol* 1985a;135:843-47.

Levine JD, Collier DH, Basbaum AI, Moskowitz MA, Helms CA. Hypothesis: the nervous system may contribute to the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1985b;12:406-11.

Li HY, Lin MS, Wei JN, Hung CS, Chiang FT, és mtsai. Change of serum vascular adhesion protein-1 after glucose loading correlates to carotid intima-medial thickness in non-diabetic subjects. *Clin Chim Acta* 2009;403:97-101.

Li YI, Hung JS, Yu TY, Liou JM, Wei JN, és mtsai. Serum vascular adhesion protein-1 predicts all-cause mortality and cancer-related mortality in subjects with colorectal cancer. *Clin Chim Acta* 2014;428:51-6.

Lin MS, Li HY, Wei JN, Lin CH, Smith DJ, és mtsai. Serum vascular adhesion protein-1 is higher in subjects with early stages of chronic kidney disease. *Clin Biochem* 2008;41:1362-7.

Lu Y, Yu SS, Zong M, Fan SS, Lu TB, és mtsai. Glucose-6-phosphate isomerase (G6PI) mediates hypoxia-induced angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Sci Rep* 2017;7:40274;doi: 10.1038/srep40274.

Luo W, Xie F, Zhang Z, Sun D. Vascular adhesion protein 1 in the eye. *J Ophtalmol* 2013;2013:925267.

Lyles GA. Mammalian plasma and tissue-boun semicarbazide-sensitive amine oxidase: biochemical, pharmacological and toxicological aspects. *Int J Biochem Cell Biol* 1996;28:259-74.

Madej A, Reich A, Orda A, Szepietowski JC. Vascular adhesion protein-1 (VAP-1) is overexpressed in psoriatic patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007;21:72-8.

Maggi CA, Meli A. The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen Pharmacol* 1988;19:1-43.

Maier C, Baron R, Tölle TR, Binder A, Birbaumer N, és mtsai. Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): somatosensory abnormalities in 1236 patients with different neuropathic pain syndromes. *Pain* 2010;150:439-50.

Malmberg AB, Basbaum AI. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain* 1998;76:215-22.

Marttila-Ichihara F, Castermans K, Auvinen K, Oude Egbrink MG, Jalkanen S, és mtsai. Small-molecule inhibitors of vascular adhesion protein-1 reduce the accumulation of myeloid cells into tumors and attenuate tumor growth in mice. *J Immunol* 2010;184:3164-73.

Marttila-Ichihara F, Smith DJ, Stolen C, Yegutkin GG, Elimä K, és mtsai. Vascular amine oxidases are needed for leukocyte extravasation into inflamed joints in vivo. *Arthritis Rheum* 2006;54:2852-62.

Matsumoto I, Staub A, Benoist C., Mathis D. Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science* 1999;286:1732-5.

Matsumoto I, Maccioni M, Lee DM, Maurice M, Simmons B, és mtsai. How antibodies to a ubiquitous cytoplasmatic enzyme may provoke joint-specific autoimmune disease. *Nat Immunol* 2002;3:360-5.

Matta C, Fodor J, Szijgyártó Z, Juhász T, Gergely P, és mtsai. Cytosolic free Ca²⁺ concentration exhibits a characteristic temporal pattern during in vitro cartilage differentiation: a possible regulatory role of calcineurin in Ca-signalling of chondrogenic cells. *Cell Calcium* 2008;44:310-23.

Mátyus P, Dajka-Halász B, Földi A, Haider N, Barlocco D, Magyar K. Semicarbazide-sensitive amine oxidase: current status and perspectives. *Curr Med Chem* 2004;11:1285-98.

Mátyus P, Magyar K, Pihlavisto M, Gyires K, Haider N, és mtsai. Compounds for inhibiting semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO)/vascular adhesion protein-1 (VAP-1) and uses thereof for treatment and prevention of diseases. 2010;PCT Int Appl WO/2010/029379.

Mátyus P, Chai CL. Metabolism-activated multitargeting (MAMUT): An innovative multitargeting approach to drug design and development. *Chem Med Chem* 2015;doi: 10.1002/cmdc.201500406.

McGaraughty S, Chu KL, Perner RJ, Didomenico S, Kort ME, Kym PR. TRPA1 modulation of spontaneous and mechanically evoked firing of spinal neurons in uninjured, osteoarthritic, and inflamed rats. *Mol Pain* 2010;6:14.

McIntyre P, McLatchie LM, Chambers A, Phillips E, Clarke M, és mtsai. Pharmacological differences between the human and rat vanilloid receptor 1 (VR1). *Br J Pharmacol* 2001;132:1084-94.

McMahon SB, Wood JN. Increasingly irritable and close to tears: TRPA1 in inflammatory pain. *Cell* 2006;124:1123-5.

McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, és mtsai. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:13525-30.

McNamee K, Williams R, Seed M. Animal models of rheumatoid arthritis: How informative they? *Eur J Pharmacol* 2015;759:278-86.

Meier R, Krug C, Golovko D, Boddington S, Piontek G, és mtsai. Indocyanine green-enhanced imaging of antigen-induced arthritis with an integrated optical imaging/radiography system. *Arthritis Rheum* 2010;62:2322-7.

Miyamoto R, Otsuguro K, Ito S. Time- and concentration-dependent activation of TRPA1 by hydrogen sulfide in rat DRG neurons. *Neurosci Lett* 2011;499:137-42.

Mlícková K, Sebela M, Cibulka R, Frébort I, Pec P, és mtsai. Inhibition of copper amine oxidases by pyridine-derived aldoximes and ketoximes. *Biochimie* 2001;83:995-1002.

Moilanen LJ, Laavola M, Kukkonen M, Korhonen R, Leppanen T, és mtsai. TRPA1 contributes to the acute inflammatory response and mediates carrageenan-induced paw edema in the mouse. *Sci Rep* 2012;2:380.

Moilanen LJ, Hämäläinen M, Nummenmaa E, Ilmarinen P, Vuolteenaho K, és mtsai. Monosodium iodoacetate-induced inflammation and joint pain are reduced in TRPA1 deficient mice--potential role of TRPA1 in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2015;23:2017-26.

Morris CJ. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods Mol Biol* 2003;225:115-21.

Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 2007;87:165-217.

Noda K, She H, Nakazawa T, Hisatomi T, Nakao S, és mtsai. Vascular adhesion protein-1 blockade suppresses choroidal neovascularization. *FASEB J* 2008;22:2928-35.

Noda K, Nakao S, Zand S, Engelstädter V, Mashima Y, Hafezi-Moghadam A. Vascular adhesion protein-1 regulates leukocyte transmigration rate in the retina during diabetes. *Exp Eye Res* 2009;89:774-81.

Obata K, Katsura H, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, és mtsai. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J Clin Invest*. 2005;115:2393-401.

Ognyanov VI, Balan C, Bannon AW, Bo Y, Dominguez C, és mtsai. (2006) Design of potent, orally available antagonists of the transient receptor potential vanilloid 1. Structure-activity relationships of 2-piperazin-1-yl-1H-benzimidazoles. *J Med Chem* 2006;49:3719-42.

Okun A, Liu P, Davis P, Ren J, Remeniuk B, és mtsai. Afferent drive elicits ongoing pain in a model of advanced osteoarthritis. *Pain* 2012;150:924-33.

Olivé M, Unzeta M, Moreno D, Ferrer I. Overexpression of semicarbazide-sensitive amine oxidase in human myopathies. *Muscle Nerve* 2004;29:261-6.

O'Rourke AM, Wang EZ, Miller A, Podar EM, Scheyhing K, és mtsai. Anti-inflammatory effects of LJP 1586 [Z-3-Fluoro-2-(4-methoxybenzyl)allylamine hydrochloride], an amine-based inhibitor of semicarbazide-sensitive amine oxidase activity. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;342:867-75.

Patil MJ, Jeske NA, Akopian AN. TRPV1 regulates activation and modulation of TRPA1 by Ca²⁺. *Neurosci* 2010;171:1109–19.

Payrits M, Ságghy É, Mátyus P, Czompa A, Ludmerczki R, és mtsai. A novel 3-(4,5-diphenyl-1,3-oxazol-2-yl)propanal oxime compound is a potent Transient Receptor Potential Ankyrin 1 and Vanilloid 1 (TRPA1 and V1) receptor antagonist. *Neuroscience* 2016;324:151-62.

Peng Y, Wang J, Zhang M, Niu P, Yang M, és mtsai. Inactivation of semicarbazide-sensitive amine oxidase stabilizes the established atherosclerotic lesions via inducing the phenotypic switch of smooth muscle cells. *PLoS One* 2016;11:e0152758.

Pereira ICP, Mendes SJF, Pereira DMS, Muniz TF, Colares VLP, és mtsai. Transient Receptor Potential Ankyrin 1 channel expression on peripheral blood leukocytes from rheumatoid arthritic patients and correlation with pain and disability. *Front Pharmacol* 2017;8:53.

Petrus M, Peier AM, Bandell M, Hwang SW, Huynh T, és mtsai. A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. *Mol Pain* 2007;3:40.

Pomonis JD, Harrison JE, Mark L, Bristol DR, Valenzano KJ, Walker K. N-(4-Tertiarbutylphenyl)-4-(3-chlorophyridin-2-yl)tetrahydropyrazine-1(2H)-carbox-amide (BCTC), a novel, orally-effective vanilloid receptor 1 antagonist with analgesic

properties: II. in vivo characterization in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306:387-93.

Poór GY. Áttörés az ízületi gyulladások kezelésében. *Magyar Tudomány* 2014;8:958-64.

Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, Rossi A, Parente L, és mtsai. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br J Pharmacol* 2004;142:331-8.

Qiang M, Xiao R, Su T, Wu BB, Tong ZQ, és mtsai. A novel mechanism for endogenous formaldehyde elevation in SAMP8 mouse. *J. Alzheimers Dis* 2014;40:103953.

Reilly RM, McDonald HA, Puttfarcken PS, Joshi SK, Lewis L, és mtsai. Pharmacology of modality-specific transient receptor potential vanilloid-1 antagonist that do not alter body temperature. *J Pharmacol Exp Ther* 2012;342:416:28.

Remadevi R, Szallisi A. Adlea (ALGRX-4975), an injectable capsaicin (TRPV1 receptor agonist) formulation for longlasting pain relief. *IDrugs* 2008;11:120-32.

Salas MM, Hargreaves KM, Akopian AN. TRPA1-mediated responses in trigeminal sensory neurons: interaction between TRPA1 and TRPV1. *Eur J Neurosci* 2009;29(8):1568-78.

Salmi M, Jalkanen S. VAP-1: An adhesin and an enzyme. *Trends Immunol* 2001a;22:211-16.

Salmi M, Yegutkin GG, Lehvonen R, Koskinen K, Salminen T, Jalkanen S. A cell surface amine oxidase directly controls lymphocyte migration. *Immunity* 2001b;14:265-76.

Salter-Cid LM, Wang E, O'Rourke AM, Miller A, Hongfeng G, és mtsai. Anti-inflammatory effects of inhibiting the amine-oxidase activity of semicarbazide-sensitive amine oxidase. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;315:553-62.

Saper JR, Klapper J, Mathew NT, Rapoport A, Phillips SB, Bernstein JE. Intranasal civamide for the treatment of episodic cluster headaches. *Arch Neurol* 2002;59:990-4.

Saunders CI, Kunde DA, Crawford A, Geraghty DP. Expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and 2 (TRPV2) in human peripheral blood. *Mol Immunol* 2007;44:1429-35.

Sawada Y, Hosokawa H, Matsumura K, Kobayashi S. Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by hydrogen peroxide. *Eur J Neurosci* 2008;27:1131-42.

Schaller M, Stohl W, Benoit V, Tan SM, Johansen L, Ditzel HJ. Patients with inflammatory arthritic diseases harbor elevated serum and synovial fluid levels of free and immune-complexed glucose-6-phosphate isomerase (G6PI). *Biochem Biophys Res Commun* 2006;349:838-45.

Schilter HC, Collison A, Russo RC, Foot JS, Yow TT, és mtsai. Effects of an anti-inflammatory VAP-1/SSAO inhibitor, PXS-4728A, on pulmonary neutrophil migration. *Respir Res* 2015;16:42.

Schnitzer TJ, Pelletier JP, Haselwood DM, Ellison WT, Ervin JE, és mtsai. Civamide cream 0.075% in patients with osteoarthritis of the knee: a 12-week randomized controlled clinical trial with a longterm extension. *J Rheumatol* 2012;39:610-20.

Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 1990;43:205-18.

Shakya AK, Kaur A, Al-Najjar BO, Naik RR. Molecular modelling, synthesis, characterization and pharmacological evaluation of benzo[d]oxazole derivatives as a non-steroidal anti-inflammatory agents. *Saudi Pharm J* 2016;24:616-24.

Sharpe L, Sensky T, Allard S. The course of depression in recent onset rheumatoid arthritis: the predictive role of disability, illness perceptions, pain and coping. *J Psychosom Res* 2001;51:713-9.

Shigetomi E, Tong X, Kwang KY, Corey DP, Khakh BS. TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nat Neurosci* 2011;15:70-80.

Shin J, Cho H, Hwang SW, Jung J, Shin CY, és mtsai. Bradykinin-12-lipoxygenase-VR1 signaling pathway for inflammatory hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:10150-5.

Singh JA, Saag KG, Bridges SL Jr, Aki EA, Bannuru RR, és mtsai. 2015 American College of Rheumatology guideline for the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2016;68:1-26.

Smith DJ, Salmi M, Bono P, Hellman J, Leu T, Jalkanen S. Cloning of vascular adhesion protein 1 reveals a novel multifunctional adhesion molecule. *J Exp Med* 1998;188:17-27.

Smolen JS, Landewé R, Breedveld FC, Buch M, Burmester G, és mtsai. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann Rheum Dis* 2014;73:492-509.

Somogyi CS, Matta C, Földvári Z, Juhász T, Katona É, és mtsai. Polymodal Transient Receptor Potential Vanilloid (TRPV) ion channels in chondrogenic cells. *Int J Mol Sci* 2015;16:18412-38.

Southall MD, Li T, Gharibova LS, Pei Y, Nicol GD, Travers JB. Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304:217-22.

Spahn V, Stein C, Zöllner C. Modulation of transient receptor vanilloid 1 activity by transient receptor potential ankyrin 1. *Mol Pharmacol*. 2014;85:335-44.

Stangenberg L, Burzyn D, Binstadt BA, Weissleder R, Mahmood U, és mtsai. Denervation protects limbs from inflammatory arthritis via an impact on the microvasculature. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111:11419-24.

Ständer S, Moormann C, Schumacher M, Buddenkotte J, Artuc M, és mtsai. Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Exp Dermatol* 2004;13:129-39.

Steinman L. Elaborate interactions between the immune and nervous system. *Nat Immunol* 2004;5:575-81.

Stolen CM, Marttila-Ichihara F, Koskinen K, Yegutkin GG, Turja R, és mtsai. Absence of the endothelial oxidase AOC3 leads to abnormal leukocyte traffic in vivo. *Immunity* 2005;22:105-15.

Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, és mtsai. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 2003;112:819-29.

Sun P, Solé M, Unzeta M. Involvement of SSAO/VAP-1 in oxygen-glucose deprivation-mediated damage using the endothelial hSSAO/VAP-1 expressing cells as experimental model of cerebral ischemia. *Cerebrovasc Dis* 2014;37:171-80.

Swanson DM, Dubin AE, Shah C, Nasser N, Chang L, és mtsai. Identification and biological evaluation of 4-(3-trifluoromethylpyridin-2-yl) piperazine-1-carboxylic acid (5-trifluoromethylpyridin-2-yl) amide, a high affinity TRPV1 (VR1) vanilloid receptor antagonist. *J Med Chem* 2005;48:1857-72.

Szabó Á, Helyes Z, Sándor K, Bite A, Pintér E, és mtsai. Role of TRPV1 receptors in adjuvant-induced chronic arthritis: in vivo study using gene-deficient mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;314:111 –9.

Szállási Á, Blumberg PM. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* 1999;51:159-212.

Szállási Á, Cruz F, Geppetti P. TRPV1: a therapeutic target for novel analgesic drugs? *Trends Mol Med* 2006;12(11):545-54.

Szekanecz Z. A rheumatoid arthritis gyakorlati kérdései. *Háziorvos Továbbképző Szemle* 2004;9:17-22.

Szolcsányi J, Jancsó-Gábor A. Sensory effects of capsaicin congeners I. Relationship between chemical structure and pain-producing potency of pungent agents. *Arzneimittelforschung* 1975;25:1877-81.

Szolcsányi J, Jancsó-Gábor A. Sensory effects of capsaicin congeners II. Importance of chemical structure and pungency in desensitizing activity of capsaicin-type compounds. *Arzneimittelforschung* 1976;26:33-37.

Szolcsányi J. Capsaicin-sensitive chemoceptive neural system with dual sensory-efferent function. In: Chahl LA, Szolcsányi J, Lembeck F, editors. *Antidromic Vasodilatation and Neurogenic Inflammation*. Budapest, Hungary: Akadémiai Kiadó; 1984. pp. 27-53.

Szolcsányi J, Helyes Zs, Oroszi G, Németh J, Pintér E. Release of somatostatin and its role in the mediation of the anti-inflammatory effect induced by antidromic stimulation of sensory fibres of rat sciatic nerve. *Br J Pharmacol* 1998a;123:936-42.

Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Z, Oroszi G, Németh J. Systemic anti-inflammatory effect induced by counter-irritation through a local release of somatostatin from nociceptors. *Br J Pharmacol* 1998b;125:916-22.

Szolcsányi J. Hot target on nociceptors: perspectives, caveats and unique feature. *Br J Pharmacol* 2008;155:1142-4.

Taylor-Clark TE, Undem BJ, Macglashan DW Jr, Ghatta S, Carr MJ, McAlexander MA. Prostaglandin-induced activation of nociceptive neurons via direct activation with transient receptor potential A1 (TRPA1). *Mol Pharmacol*. 2008;73:274-81.

Tábi T, Szökő É, Mérey A, Tóth V, Mátyus P, Gyires K. Study on SSAO enzyme activity and anti-inflammatory effect of SSAO inhibitors in animal model of inflammation. *J Neural Transm (Vienna)* 2013;120:963-7.

Tierney M, Fraser A, Kennedy N. Physical activity in rheumatoid arthritis: a systematic review. *J Phys Act Health* 2012;9:1036-48.

Tékus V, Hajna Z, Borbély É, Markovics A, Bagoly T, és mtsai. A CRPS-IgG-transfer-trauma model reproducing inflammatory and positive sensory signs associated with complex regional pain syndrome. *Pain* 2014;155:299-308.

Tokha S, Lauknen M, Jalkanen S, Salmi, M. Vascular adhesion protein 1 (VAP-1) functions as a molecular brake during granulocyte rolling and mediates recruitment in vivo. *FASEB J* 2001;15:373-82.

Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, és mtsai. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 1998;21:531-43.

Tong Z, Wang W, Luo W, Ly J, Luo H, és mtsai. Urine formaldehyde predicts cognitive impairment in post-stroke dementia and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2017;55:1031-38.

Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Destrovsky JO, és mtsai. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology* 2008;70:1630-5.

Trevisani M, Siemens J, Materazzi S, Bautista DM, Nassini R, és mtsai. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:13519-24.

Trevisan G, Materazzi S, Fusi S, Altomare A, Aldini G, és mtsai. Novel therapeutic strategy to prevent chemotherapy-induced persistent sensory neuropathy by TRPA1 blockade. *Cancer Res* 2013;73:3120-31.

Unzeta M, Solé M, Boada M, Hernández M. Semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) and its possible contribution to vascular damage in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2007;114:857-62.

Valenzano KJ, Grant ER, Wu G, Hachicha M, Schmid L, és mtsai. N-(4-tertiarybutylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl)tetrahydropyrazine-1(2H)-carbox-amide (BCTC), a novel, orally effective vanilloid receptor 1 antagonist with analgesic properties: I. in vitro characterization and pharmacokinetic properties. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306:377-86.

Vinegar R, Truax JF, Selph JL, Johnston PR, Venable AL, McKenzie KK. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. *Fed Proc* 1987;46:118-26.

Vyklicky L, Nováková-Tousová K, Benedikt J, Samad A, Touska F, Vlachová V. Calcium-dependent desensitization of vanilloid receptor TRPV1: a mechanism possibly involved in analgesia induced by topical application of capsaicin. *Physiol Res* 2008;57:S59-S68.

Wang EZ, Gao H, Salter-Cid L, Zhang J, Huang L, és mtsai. Design, synthesis, and biological evaluation of semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) inhibitors with anti-inflammatory activity. *J Med Chem* 2006;49:2166-73.

Wang S, Dai Y, Fukuoka T, Yamanaka H, Kobayashi K, és mtsai. Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. *Brain* 2008;131:1241:51.

Watabiki T, Kiso T, Kuramochi T, Yonezawa K, Tsuji N, és mtsai. Amelioration of neuropathic pain by novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist AS1928370 in rats without hyperthermic effect. *J Pharmacol Exp Ther* 2011;336:743:50.

- Wei H**, Hämäläinen MM, Saarnilehto M, Koivisto A, Pertovaara A. Attenuation of mechanical hypersensitivity by an antagonist of the TRPA1 ion channel in diabetic animals. *Anesthesiology* 2009;111:147-54.
- Winter CA**, Risley EA, Nuss GW. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Bio Med*. 1962;111:544-47.
- Xi N**, Bo Y, Doherty EM, Fotsch C, Gavva NR, és mtsai. Synthesis and evaluation of thiazole carboxamides as vanilloid receptor 1 (TRPV1) antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* 2005;15(23):5211-7.
- Xu HL**, Salter-Cid L, Linnik MD, Wang EZ, Paisansathan C, Pelligrino DA. Vascular adhesion protein-1 play an important role in postischemic inflammation and neuropathology in diabetic, estrogen-treated ovariectomized female rats subjected to transient forebrain ischemia. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;317:19-29.
- Yasuda H**, Toiyama Y, Ohi M, Mohri Y, Miki C, Kusunoki M. Serum soluble vascular adhesion protein-1 is a valuable prognostic marker in gastric cancer. *J Surg Oncol* 2011;103:695-9.
- Young A**, Koduri G. Extraarticular manifestations and complications of rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2007;21:907-27.
- Yu PH**, Shannon W, Fan EH, Lun ZR, Gubisne-Harberle D. Physiological and pathological implications of semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Biochim Biophys Acta* 2003;1647:193-9.

PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

1. Az értekezés alapját képező eredeti közlemények:

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

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

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

2. Egyéb teljes közlemény:

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

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

Az összes publikáció kumulatív impakt faktora: 11,892

Hivatkozások száma: 5

Független hivatkozások száma: 3

3. Konferencia szóbeli előadások:

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

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

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

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

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

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

Horváth Á., Menghis A., Botz B., Borbély É., Csepregi J., Mócsai A., Czompa A., Ludmerczki R., Mátyus P., Pintér E., Szolcsányi J., Helyes Zs. Anti-inflammatory and

analgesic effects of semicarbazide-sensitive amine-oxidase (SSAO) inhibitors in chronic arthritis mouse models. International CEEPUS Summer School on Complex Diseases, Portoroz, Szlovénia, 2015.

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

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

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

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

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

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

Helyes Z, **Horváth Á**, Tékus V, Scheich B, Pintér E, Csepregi J, Mócsai A, Bogdán D, Mátyus P. Analgesic affects of the novel semicarbazide-sensitive amine-oxidase inhibitor

SzV-1287 in animal models of pain. 7th European Congress of Pharmacology, Isztambul, Törökország, 2016.

4. Konferencia poszter prezentációk:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Prof. Dr. Helyes Zsuzsannának TDK, majd PhD munkám során nyújtott rengeteg segítségét és türelmét. Fantasztikus lelkesedése, hatalmas szakmai tudása és közvetlensége nemcsak nekem, hanem mindenki számára követendő példát jelent.

Köszönöm a Doktori Iskola vezetőjének és intézetvezetőnknek, Prof. Dr. Pintér Erikának, hogy lehetővé tette az intézetben végzett munkámat és köszönöm hasznos szakmai tanácsait, amelyekkel ellátott az eddig itt töltött évek során.

Köszönöm Szolcsányi János Professzor Úrnak, hogy példát mutatott a kutatói pálya iránti elhivatottságból, és köszönöm Prof. Dr. Pethő Gábornak, hogy lehetővé tette oktatómunkámat.

Szeretnék köszönetet mondani egykori TDK témavezetőmnek és jelenlegi kolléganőmnek, Dr. Tékus Valériának, hogy megmutatta a kutatómunka gyakorlati oldalát, és akihez nemcsak a diákkörös, hanem PhD-s éveim alatt is bármikor fordulhattam szakmai tanácsért.

Köszönöm Dr. Borbély Évának, Dr. Szőke Évának, Dr. Kemény Ágnesnek, Dr. Bölcskei Katának, Dr. Boros Melindának, Dr. Pozsgai Gábornak és Dr. Scheich Bálintnak a kísérletek során nyújtott segítségüket és értékes iránymutatásaikat. Külön köszönet korábbi PhD hallgatótársamnak, Dr. Botz Bálintnak az *in vivo* képalkotó módszerek elsajátításában nyújtott segítségével.

Nagyon hálás vagyok Perkecz Anikónak a kiváló szövettani munkájáért, illetve Góglné Kati néninek, Ömböliné Dórinak, Bagoly Teréznek, Szentes Nikolettnek és Kiss Tamásnak a professzionális asszisztensi munkájukért.

Köszönettel tartozom PhD hallgatótársaimnak, illetve a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet összes dolgozójának a vidám hétköznapiokért és a nyugodt alkotói légkör megteremtéséért.

Kollaborátoraink közül köszönet illeti Csepregi Jankát és Prof. Dr. Mócsai Attilát a BxN és K/BxN szérumok biztosításáért, Prof. Dr. Mátyus Pétert és kollégáit az SSAO-gátló vegyületek szintéziséért, Dr. Zákány Rózát és Dr. Juhász Tamást a porcsejtek tenyésztéséért és metakromáziás festéséért, illetve Awt Menghist és Julie Keeblet az SSAO-gátlók hatástani vizsgálatáért CFA-indukált artritiszben.

Végül szeretném megköszönni családom, különösen édesanyám és menyasszonyom végtelen türelmét és támogatását, nélkülük e dolgozat nem valósulhatott volna meg.

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