

P2Y₁₂ receptor részvétele különböző állatkísérletes
fájdalommodellekben: *in vivo*
viselkedésfarmakológiai vizsgálatok és a
háttérmechanizmus felderítése

Doktori értekezés

Horváth Gergely

Semmelweis Egyetem

Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Sperlágth Beáta, MTA doktora, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Pethő Gábor, PhD., egyetemi tanár

Dr. Riba Pál, PhD., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szökő Éva, MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Helyes Zsuzsanna, PhD., egyetemi tanár

Dr. Zelles Tibor, PhD., egyetemi docens

Budapest

2017

Tartalom

1. Rövidítések jegyzéke.....	4
2. Bevezetés.....	7
2.1. A fájdalom.....	7
2.1.1. A fájdalom pályarendszerei.....	8
2.2. Az immunrendszer és az idegrendszer kapcsolata	9
2.3. Purinerg jelátvitel	10
2.3.1. Purin receptorok	11
2.3.2. A P2Y ₁₂ receptor	12
2.4. P2Y ₁₂ receptor és fájdalom kapcsolata.....	14
3. Célkitűzések	16
3.1. P2Y ₁₂ receptorgátlás vizsgálata a fájdalom különböző állatmodelljeiben	16
3.2. P2Y ₁₂ receptor antagonisták farmakológiai aktivitásának felmérése	16
3.3. A P2Y ₁₂ receptor gátlással okozott hatások háttérmechanizmusainak felderítése	16
3.4. P2Y ₁₂ receptor antagonisták esetleges mellékhatásainak vizsgálata	17
4. Anyagok és módszerek.....	18
4.1. Kísérleti állatok	18
4.2. Kezelések	18
4.3. Fájdalommodellek.....	19
4.3.1. Akut termális fájdalom.....	19
4.3.2. CFA indukált gyulladásoos fájdalom	20
4.3.3. Neuropátiás fájdalommodell	21
4.4. Mellékhatás vizsgálatok	21
4.4.1. Rotarod teszt.....	21
4.4.2. <i>Ex vivo</i> trombocita aggregáció mérése.....	22
4.5. cAMP mérés.....	23
4.6. Szubdiafragmatikus vagotómia (VGX).....	24
4.7. Molekuláris biológiai vizsgálatok	25
4.7.1. Kvantitatív Real-Time PCR P2Y ₁₂ R mRNS expressziójának vizsgálatára.....	25
4.7.2. Interleukin 1-béta expresszió mérése ELISA módszerrel	26
4.7.3. Multiplex citokin mérés Luminex platform segítségével	27
4.7.4. Citokin mérés FACS segítségével	28
4.8. HPLC analízis	29
4.9. Statisztikai módszerek.....	29

5. Eredmények.....	31
5.1. P2Y ₁₂ receptor antagonisták antinociceptív hatásai a különböző fájdalommodellekben .	31
5.1.1. Hot plate teszt.....	31
5.1.2. CFA indukált gyulladásoos fájdalom.....	37
5.1.3. Neuropátiás fájdalommodell	44
5.1.4. P2Y ₁₂ receptor génkiütés nocifenzív reakciót befolyásoló hatása.....	52
5.2. P2Y ₁₂ antagonisták aktivitása rekombináns P2Y ₁₂ receptoron	55
5.3. Háttérmechanizmus vizsgálat.....	64
5.3.1. Real-Time PCR a P2Y ₁₂ receptor expressziójának meghatározására	64
5.3.2. A gyulladás időbeli lefutása: IL-1 β produkció mérés a gyulladt talpban és a gerincvelőben 48, illetve 96 órával intraplantáris CFA kezelést követően	66
5.3.3 Multiplex citokin mérés Luminex platformon	69
5.3.4. P2Y ₁₂ receptor génkiütés IL-1 β szintet befolyásoló hatása	75
5.3.5. Az efferens hatásmechanizmus vizsgálata	77
5.4. Mellékhatás vizsgálatok	80
5.4.1. Mozgás koordinációs teszt (Rotarod).....	80
5.4.2. Trombocita aggregáció vizsgálata <i>ex vivo</i>	81
6. Megbeszélés	84
6.1. P2Y ₁₂ antagonisták hatásának vizsgálata különböző rágsáló fájdalommodellekben	84
6.2. P2Y ₁₂ antagonisták 2-MeSADP által gátolt cAMP szintre gyakorolt hatásának vizsgálata	88
6.3. A P2Y ₁₂ receptorgátlás okozta fájdalomcsillapító hatás háttérmechanizmusa.....	90
6.4. Mellékhatás vizsgálatok	93
7. Következtetések	94
7.1. P2Y ₁₂ receptorgátlás vizsgálata fájdalom különböző állatmodelljeiben.	94
7.2. P2Y ₁₂ receptor antagonisták farmakológiai aktivitásának felmérése	95
7.3. A P2Y ₁₂ receptor gátlással okozott hatások háttérmechanizmusainak felderítése.	95
7.4. Az általunk használt P2Y ₁₂ receptor antagonisták esetleges mellékhatásainak vizsgálata.	98
8. Összefoglalás.....	100
9. Summary	101
10. Irodalomjegyzék.....	102
11. Saját publikációk.....	108
12. Köszönetnyilvánítás	109

1. Rövidítések jegyzéke

5-HT: Szerotonin

2-MeSADP: 2-Methyl-thioADP

2-MeSATP: 2-Methyl-thioATP

6-OHDA: 6-hydroxydopamine, 6-hidroxidopamin

$\alpha 7$ nAChR: alfa-7 nikotinos acetilkolin receptor

ADA: Adenosine deaminase, adenzin-deamináz

ADP: Adenosine diphosphate, adenzin difoszfát

A_{max} : Maximal Aggregation, maximális aggregáció

AMP: Adenosine monophosphate, adenzin monofoszfát

ANOVA: Egyszempontú varianciaanalízis

ATP: Adenosine triphosphate, adenzin trifoszfát

BBB: Blood-Brain Barrier, vér-agy gát

bzATP: 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosine 5'-triphosphate

cAMP: ciklikus adenzin monofoszfát

CFA: Complete Freund's Adjuvant, komplett Freund adjuváns

CHO: Chinese Hamster Ovary, kínai hörcsög ovárium

COX: cyclooxygenase, ciklooxygenáz

CREB: cAMP Response Element Binding protein

CRH: corticotropin-releasing hormone

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DOPEG: 3,4-dihidroxifenil-glikol,

DRG: Dorsal Root Ganglion, hátsó gyöki dúc

EC₅₀: half maximal effective concentration, félmaximális hatékony koncentráció

E_{max}: Maximal Efficacy, maximális hatáserősség

FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting, fluoreszcencia aktivált sejtszortírozás

FBS: Foetal Bovine Serum, magzati szarvasmarha szérum

GIRK: G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel, G fehérje kapcsolt befelé egyenirányító kálium csatorna

IC₅₀: half maximal inhibitory concentration, félmaximális gátló koncentráció

IL-10: Interleukin-10

IL-1 β : Interleukin-1 béta

IL-6: Interleukin-6

im: Intramuscularis

ip: Intraperitoneális

it: Intrathecalis

KO: knockout, génkiütött (-/-)

L4-5: lumbális 4-5. csigolyák

LPS: Lipopolisaccharide, lipopoliszacharid

mED: Minimal Effective Dose, legkisebb hatékony dózis

MLA: Metil-akonitin

NSAID: Non-Steroid Anti-Inflammatory Drug, nem szteroidális gyulladáscsökkentő

NK: Natural Killer, természetes ölősejt

OGR: Orvosi géntechnológiai részleg

PAG: Periaqueductal Gray, Periaqueductalis szürkeállomány

pK_b: egyensúlyi disszociációs konstans

PLC: Phospholipase-C, Fosfolipáz-C

PPADS: Piridoxal foszfát-6-azo(benzén-2,4-diszulfonsav)

PPP: Platelet Poor Plasma, vérlemezkében szegény plazma

PRP: Platelet Rich Plasma, vérlemezkében gazdag plazma

PSNL: Partial Sciatic Nerve Ligation, részleges ülőideg lekötés

P2Y₁₂ R: P2Y₁₂ receptor

PWT: Paw Withdrawal Threshold, végtagelrántási küszöbérték

RNS: ribonukleinsav

RPM: Round per Minute, percenkénti fordulatszám

rRNS: riboszómális RNS

SEM: Standard Error of the Mean, standard hiba

sEPSC: Spontaneous Excitatory Postsynaptic Current, spontán excitátoros posztszinaptikus áram

sIPSC: Spontaneous Inhibitory Postsynaptic Current, spontán gátló posztszinaptikus áramok

SPF: Specific Patogen Free, specifikus patogénektől mentes

TNF α : Tumor Necrosis Factor α

UTP: Uridine triphosphate, uridin trifoszfát

VGCC: Voltage gated calcium channel, feszültségfüggő kalciumcsatorna

VGX: vagotómia

VPL: Ventral posterolateralis

VPM: ventral posteromedialis

WT: wild-type, vad típusú (+/+)

2. Bevezetés

A fájdalomcsillapítás a gyakorló orvos alapvető mindennapi, fontos tevékenysége és egyben kötelessége, ezért nem meglepő, hogy a fájdalomcsillapítók a leggyakrabban rendelt gyógyszerek közé tartoznak. A különböző fájdalomcsillapító készítmények azonban igen eltérőek hatás és mellékhatás, tolerancia-dependencia, valamint biztonság szempontjából. Jelenleg a leghatékonyabb fájdalomcsillapítók az ópiát receptoron ható szerek, melyeket jellemzően súlyos esetekben alkalmaznak. Ezek igen kedvező hatékonyságú analgetikumok, alkalmazhatóságuk azonban korlátozott a használatuk során kialakuló tolerancia-dependencia miatt, ezért csak erős fájdalmak esetén alkalmazhatóak például daganatos betegségek palliatív terápiája során.

A jelenleg széleskörűen használt fájdalomcsillapítók, a nem-szteroid gyulladáscsökkentő fájdalomcsillapító szerek (NSAID), gyengébb, eseti fájdalomcsillapításra alkalmasak, hosszú távú alkalmazásuk azonban ugyancsak nem javasolt. A nem szteroid gyulladáscsökkentő fájdalomcsillapítók használatának a kockázatai igen eltérőek lehetnek, a paracetamol okozta máj toxicitástól az acetilszalicilát által kiváltott fokozott vérzékenységig (pl. gyomorvérzés). Mindemellett bizonyos típusú fájdalmak ezekre a szerekre nem reagálnak kellően, ilyen például a neuropathiás fájdalom vagy a migrén és egyéb olyan középerős fájdalmak, amelyeknél az ópiátok adása túl kockázatos lenne. Ezért intenzív kutatómunka folyik új fájdalomcsillapító gyógyszercélpontok azonosítása és az azokon ható gyógyszerek kifejlesztése céljából.

2.1. A fájdalom

A fájdalom egy kellemetlen emocionális és szenzoros tapasztalat, mely alapvető és nélkülözhetetlen az életben maradáshoz, ugyanis a tényleges és potenciális szöveti károsodásról tájékoztat. Hiányában kiesnek azok a mechanizmusok, amelyek a veszélyforrásokat kiiktathatják. A fájdalomingert felvevő receptorok megtalálhatók szinte az egész szervezetben: a bőrben, csontszövetben (fogbél, csonthártya), ízületekben, a nagy kiterjedésű savós hártyákban, zsigeri szervekben (gyomor-és béltraktus), az izomzatban, urogenitáliákban.

2.1.1. A fájdalom pályarendszerei

A testet érő fájdalmat okozó ingereket (mechanikai-, hő- valamint kémiai ingereket) primer afferens rostok szállítják a gerincvelőbe. Ezek uni- és bimodális A δ valamint bi- és polimodális C rostok, melyek sejttestjei a hátsó gyöki ganglionban (DRG) találhatóak. A gerincvelőt elérő axonok felszálló és leszálló kollaterálisokat képezve alkotják a Lissauer-féle dorsolateralis traktust. Az axonok a DRG-hez képest csak egy vagy két szegmensen távolabb lépnek be a gerincvelő szürkeállományába, ahol az ingerület átadása a megfelelő gerincvelői szegmens I, II valamint IV-VI rétegeiben történik. A primer afferens rostok projekciós- illetve interneuronokhoz kapcsolódhatnak, mely lehet közvetlen kapcsolat, vagy történhet indirekt módon, úgynevezett glomerulusokon keresztül (Zeilhofer és munkatársai, 2012). A glomerulusok a primer afferens axonból, valamint a projekciós neuronok és az interneuronok dendritjeiből állnak. A felszálló projekciós pálya lehet nociceptív, specifikus pálya, melyen magas ingerküszöbű A δ és C rostok végződnek vagy széles, multimodális, dinamikus sávú felszálló pálya, melyen az említett magas küszöbű rostok mellett alacsony ingerküszöbű A β rostok is végződést adnak.

A fájdalom afferentációját illetően az alábbi pályarendszerek ismertek:

a, A rostok nagy része átkereszteződik és az anterolaterális kötegeket képezve alkotja a tractus spinothalamicust, mely a gerincvelőt elhagyva a nyúlvelő, híd és mesencephalon után a thalamusban végződik. A thalamus különböző magcsoportjai eltérő eredetű információt továbbítanak párhuzamos pályákon a kéreg felé: a ventral posterolateralis (VPL) magok a törzs és végtagok felől érkező afferentációt, a ventral posteromedialis (VPM) magcsoport pedig a trigeminus felől érkező ingerületet közvetíti. A cortex a fájdalomérzet diszkriminatív, értelmező feldolgozását végzi.

b, Egy másik pályarendszer a gerincvelő mélyebb rétegeiből induló tractus spinoreticularis, mely rostjainak nagy része keresztezett, de van köztük olyan is, ami azonos oldalon halad a nyúlvelői formatio reticularison átkapcsolva a hipotalamus illetve a limbikus rendszer felé. Funkcionálisan a központi idegrendszeri noradrenerg

rendszer aktiválása, illetve a fájdalomra bekövetkező endokrin hatások kiváltása a feladata.

c, A harmadik, ismert felszálló pályarendszer a tractus spinomesencephalicus, amely a középagy periaqueductalis szürkeállományában végződik, feladata a leszálló adrenerg pálya aktiválása révén megvalósuló fájdalom gátlása.

d, A legutóbb feltárt pálya a tractus spinothalamicus, amely a hypothalamusba projiciál és a fájdalomra adott endokrin válaszok kiváltása a feladata.

A központi idegrendszer a szervezetet érő nociceptív stimulusok által okozott fájdalmat különböző szinten képes csillapítani. Az egyik lehetséges mechanizmus gerincvelői szinten valósul meg, ezt a fájdalom kapuzás elmélete írja le. A kapuzás értelmében, az afferens C rostok által aktivált gátló interneuronokat A β és A δ rostok vezérlik. Emellett szupraspinalis gátlás is történhet, melyet a leszálló analgetikus pályák közvetítenek. Ezek a pályák a Periaqueductalis szürkeállomány (PAG) dinorfin, enkefalin, 5-HT tartalmú sejtjeiből, a thalamusból és a köztiagy capsula internaból erednek, a nyúltvelőben 5-HT és noradrenerg átkapcsolást követően a gerincvelő gátló interneuronjait serkentve gátolják a projekciós neuront. Ezek az opiátokkal is ingerelhető interneuronok képesek gátolni a primer afferens neuronok transzmitterleadását preszinaptikusan, vagy a spinothalamicus pálya neuronjait posztszinaptikusan.

2.2. Az immunrendszer és az idegrendszer kapcsolata

Az immunrendszer és az idegrendszer kapcsolata ma is intenzív kutatási terület. A mai álláspont szerint az idegrendszer és az immunrendszer együtt működve, különböző jelátviteli utakon sokrétűen szabályozzák egymás működését (Elenkov és munkatársai, 2000). Az interleukin-1 (IL-1), az interleukin-6 (IL-6) valamint a tumor nekrozis faktor alfa (TNF-alfa, TNF- α) egy komplex CRH-függő útvonalon is képes aktiválni a szomatikus idegrendszert, illetve a hipotalamo-hipofizeális tengelyt. Ismeretes, hogy perifériás IL-1 kezelés hatására fokozódik a noradrenalin turnover a hypothalamusban, illetve fokozódik a vérplazma és a központi idegrendszer noradrenalin metabolizmusa. Hasonló hatású az intracerebrovaszkuláris és perifériás α -interferon, illetve a kortikotrop releasing faktor is. A szimpatikus idegrendszer feedback rendszerének

afferensei a vérplazma citokinjei, vagy direkt vagus hatás, ami képes aktiválni a stresszrendszer központi elemeit, az efferensek pedig a nyirokszerveket beidegző szimpatikus rostok. IL-1 β , illetve IFN α hatására az NK (natural killer, természetes ölősejt) sejtek aktivációja, valamint az IL-1/IL-2 termelés csökken, ezáltal parakrin módon regulálva a citokin egyensúlyt. A gyulladásos folyamatok, illetve különböző immunválaszok eltérő pályákat és alrendszereket képesek aktiválni, ezért különböző perifériás hatásaik lehetnek. Fontos megemlíteni az idegrendszer és az immunrendszer közötti dopaminerg kapcsolatot (Tóth és munkatársai), mely kétirányú és autokrin/parakrin szabályozású. A Tóth és munkatársai által közölt tanulmány szerint a perifériáról érkező limfociták (elsősorban T-sejtek) a vér-agy gáton (BBB) történő penetráció után újabb érési folyamatokon esnek át, melyben a központi idegrendszerben szekretálódó neurotranszmitterek is szerepet játszhatnak. Ezt követően a periférián képesek a gyulladást modulálni.

A központi idegrendszer és az immunrendszer bolygóideg által közvetített jelátviteli kapcsolatát Tracey és munkatársai (Libert, 2003; Tracey és munkatársai, 1986) azonosították: ez a *nervus vagus* mediált jelátviteli út elsősorban a makrofágok TNF- α és IL-1 termelését befolyásolja. Az már korábban is ismert volt, hogy a bolygóideg (*n. vagus*) stimulálásakor acetilkolin szabadul fel az idegvégződésekből. A makrofágok nikotinos acetilkolin receptort expresszálnak, és a felszabaduló acetilkolin hatására TNF- α szekréciójának csökkentésével reagálnak (Libert, 2003). Tracey és munkatársai azonosították a nikotinos alfa-7-acetilkolin-receptort ($\alpha 7$ nAChR), mint a gyulladásos mechanizmusban kulcsfontosságú receptort makrofágokon. Farmakológiai blokádot követően sem az acetilkolin sem a nikotin nem voltak képesek kivédeni a TNF- α felszabadulást. $\alpha 7$ nikotinos acetilkolin receptor deficiens állatokon végzett kísérletek során lipopoliszacharid (LPS) hatására fokozott TNF, IL-1 és IL-6 termelést írtak le (Libert, 2003). Ezekon az egereken elektromos vagusstimuláció sem okozott védő hatást a citokintermelés szempontjából.

2.3. Purinerg jelátvitel

Az adenzin trifoszfát (ATP) univerzálisan jelenlevő vegyület az élő szervezetben. Nemcsak a sejt-mint önálló biológiai, működési struktúra- energiaellátásában játszik szerepet, hanem fontos jelátviteli funkcióval rendelkezik (Burnstock, 1996; Neary és

munkatársai, 1996). Az ATP idegrendszeri aktivitás, különböző, fizikai behatások, gyulladás vagy sejthalál következtében szabadulhat fel és purin receptorokon fejt ki hatását. Az ATP-t a felszabadulást követően ekto-ATP-áz enzimek bontják, melynek következtében adenzin difoszfáttá (ADP), adenzin monofoszfáttá (AMP), végül adenzinné alakul az anorganikus foszfátcsoportok elvesztésével. Az egyes metabolitokat különböző purin illetve adenzin receptorok kötik meg. Az adenzin inozinra bomlik adenzin-deamináz (ADA) által katalizált reakcióban, vagy egy transzporter molekula segítségével képes visszajutni az intracelluláris térbe, ahol enzimatikusan ATP képződik belőle és visszakerül az ATP raktárakba (Beamer és munkatársai, 2016).

2.3.1. Purin receptorok

A mai klasszifikáció szerint a purin receptoroknak három nagy csoportja létezik. A P1 receptorcsaládnak, melyeket adenzin-receptoroknak is nevezünk, négy altípusa van: A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃. Ezek a receptorok mind G-fehérjéhez kapcsoltnak aktiválják vagy gátolják a foszfolipáz C, vagy az adenil-cikláz transzdukciós utakat. A P1 receptorok adenzinnal aktiválhatók és xantinszármazékokkal gátolhatók.

A P2X és P2Y receptorok agonistái különböző purin és pirimidin nukleotidok (ATP, ADP, UTP, stb.).

A P2X receptorok ligand-függő, nem szelektív kation csatornák, melyeket különböző altípusú P2X receptor alegységek (P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6, P2X7) alkotnak. A csatornák lehetnek hetero- és homotrimer szerkezetűek is. A P2X receptorok két transzmembrán doménnel rendelkeznek; a C- és N-terminálisok intracellulárisan, a ciszteingazdag hurok, amely az ATP kötőhelyet, valamint az antagonisták és modulátorok kötőhelyeit is tartalmazza, extracellulárisan található (Csölle, 2013; Papp, 2009; Ralevic, Burnstock, 1998). A P2X receptorok endogén agonistái az ATP és ADP, szintetikus agonistái közül ismert a 2-methylthio-ATP (2-MeSATP) vagy a benzobenzoilATP (bzATP), melyek bizonyos alegység összetételű P2X receptor komplexet képesek aktiválni (Burnstock és munkatársai, 2011). A P2X receptorok nem szelektív gátlószerei a suramin, illetve a PPADS, melyek a P2X4 és P2X6 receptorok kivételével az összes P2X receptorot gátolják. A P2X receptorok expresszálódnak a központi idegrendszerben a hippokampuszban, a gerincvelőben, a

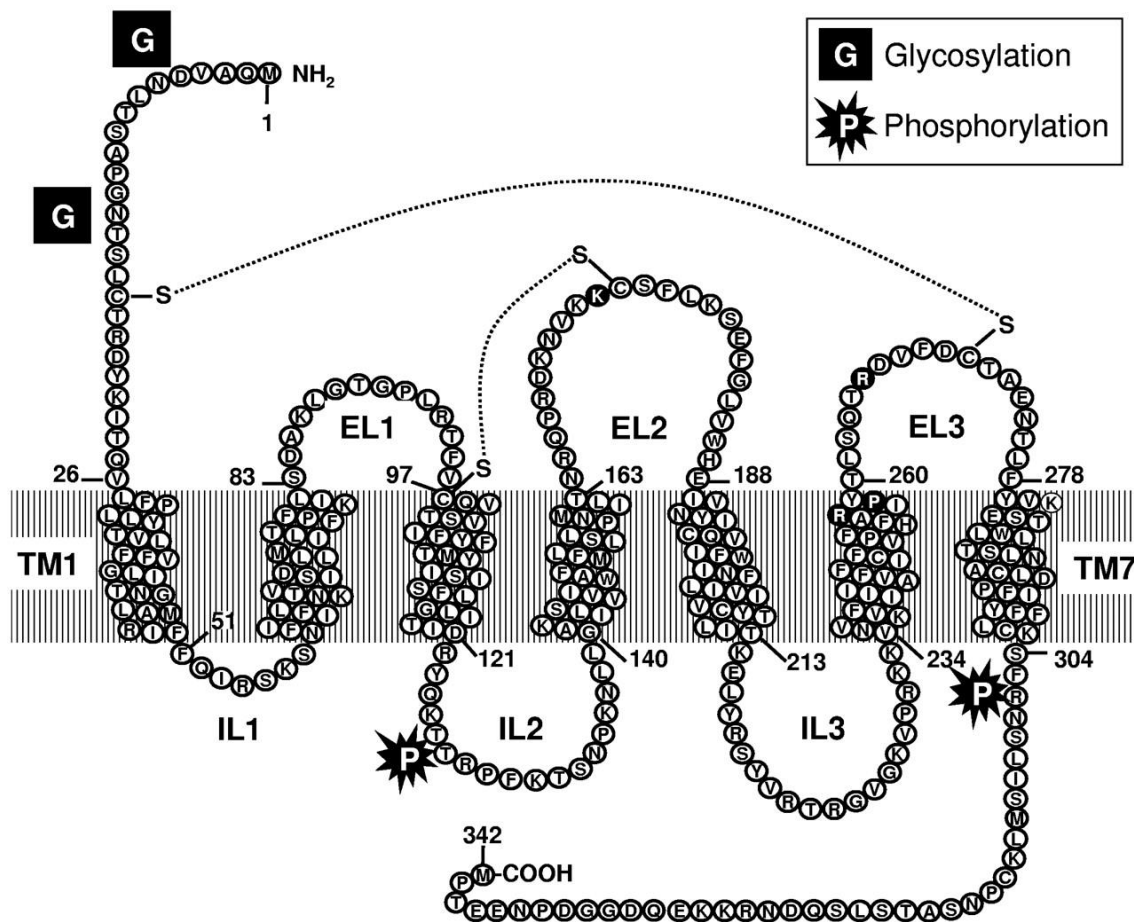
kortexben, de jelen vannak a DRG-ben is, illetve a primer afferens neuronokon (Bardoni és munkatársai, 1997; Dunn és munkatársai, 2001; Heinrich, 2013; Illes és munkatársai, 1996; Mori és munkatársai, 2001; Pankratov és munkatársai, 1998; Petruska és munkatársai, 2000). A széleskörű expresszióból arra lehet következtetni, hogy a P2X receptorok fontos szerepet játszhatnak különböző idegrendszeri kórképekben és a fájdalom transzmisszióban is.

A purinoceptorok harmadik csoportját a metabotróp, G-fehérjékkel kapcsolt P2Y receptorok alkotják, melyek hét transzmembrán régióval, extracelluláris amino- és intracelluláris karboxiterminális csoporttal rendelkeznek. Emlősökben eddig nyolcféle P2Y receptort klónoztak (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄) (Burnstock és munkatársai, 2011). A P2Y receptorok agonista hatására történő konformációs változásokkor a G proteinek leválnak a receptor intracelluláris részéről és továbbítják a jelet a foszfolipáz-C (PLC) és adenilát-cikláz transzdukciós útvonalakon. A P2Y receptorok endogén agonistái az adenin nukleotidok (P2Y_{1,11,12,13}) vagy pirimidin nukleotidok (P2Y_{4,6}), de a P2Y₂ receptor érzékeny purin és pirimidin trifoszfátokra egyaránt. A P2Y₁₄ receptor UDP-glükózra és UDP-galaktózra aktiválódik (Burnstock és munkatársai, 2011; Chang és munkatársai, 1995; Communi és munkatársai, 2001; Communi és munkatársai, 1999; Hollopeter és munkatársai, 2001; von Kugelgen, Wetter, 2000; Webb és munkatársai, 1993). A P2Y receptorok antagonistái közül jól ismert a suramin és a reactive-blue 2, melyek nem szelektív vegyületek. A Piridoxal foszfát-6-azo(benzén-2,4-diszulfonsav) PPADS P2Y₁ receptoron is hat. A P2Y receptorok expresszálódnak a primer afferens neuronon (Hussl, Boehm, 2006), a hátsó gyöki ganglion sejtjein (Gerevich és munkatársai, 2004), illetve a központi idegrendszer neuronjain, valamint a mikroglia. A P2Y receptorok szerepe ismert a neuromodulációban, differenciációban, neuron-glia kommunikációban és az idegrendszer gyulladásos folyamatainak a szabályozásában (Burnstock és munkatársai, 2011).

2.3.2. A P2Y₁₂ receptor

A humán P2Y₁₂ receptort 2001-ben klónozták először, vélemezke cDNS könyvtárból (Hollopeter és munkatársai, 2001), azóta ismerjük a receptor pontos aminosav sorrendjét, térbeli szerkezetét és legfontosabb tulajdonságait. A P2Y₁₂ receptor 342

aminosavból álló membránfehérje, mely a metabotróp P2Y receptorok jellegzetességeit mutatja: hét transzmembrán régióval és három extracelluláris hurokkal rendelkezik (Gachet, 2012)(**1. ábra**). A receptor amino terminálisa extracellulárisan, a karboxi terminálisa pedig intracellulárisan található. A P2Y₁₂ receptorokhoz intracellulárisan G_{ai/o} fehérjék kapcsolódnak, melyek aktiváció esetén adenil cikláz gátláshoz és ciklikus AMP (cAMP) csökkenéséhez vezetnek (Bodor és munkatársai, 2003), de Abbracchio és munkatársai leírták a receptor PLC-vel való kapcsoltságát is (Abbracchio és munkatársai, 2006). A szakirodalomban a G_{β/γ} alegységen keresztül történő jelátvitelt is leírták: a dimer G fehérje képes gátolni a feszültségfüggő Ca²⁺ csatornákat (VGCC), illetve GIRK csatornákhöz kapcsolódva kálium konduktancia fokozódását eredményezheti (Dolphin, 2003; Shankar és munkatársai, 2004).



1. ábra a P2Y₁₂ receptor szerkezete (Cattaneo, 2011)

A P2Y₁₂ receptor megtalálható a vérlemezkén, az endothéliumon valamint simaizom sejteken, illetve az idegrendszeri mikroglían. Elsődleges szerepe a trombocita

aggregációban ismert. A purinerg receptorok közül a P2Y₁₂ az egyetlen, amelyik immár széles körben használt terápiás célpont stroke prevencióban, vagy akut coronaria szindrómában. A rajta ható tienopiridinek és egyéb szerkezetű P2Y₁₂ receptor blokkolók (clopidogrel, ticlopidine, cangrelor, prasugrel, ticagrelor) hatékonyságuk és biztonságosságuk tekintetében előnyösebb tulajdonságokkal rendelkeznek, mint a korábban elsőrendű terápiás szerként alkalmazott ciklooxygenáz gátlók (COX-gátlók). A P2Y₁₂ receptor felfedezését követően központi idegrendszeri lokalizációt is leírtak. Tudjuk, hogy a receptor mRNS szinten kimutatható hippokampális neuronokon (Rodrigues és munkatársai, 2005), illetve protein szinten mikroglián (Kobayashi és munkatársai, 2006; Kobayashi és munkatársai, 2008; Sasaki és munkatársai, 2003), de különböző irodalmi adatok leírják a receptor fehérje szintű kifejeződését oligodendrocitán és asztrocitán is (Amadio és munkatársai, 2006; Franke és munkatársai, 2004; Fumagalli és munkatársai, 2003). A központi idegrendszerben a P2Y₁₂ receptort az amygdala, a nucleus caudatus, a corpus callosum, a hippocampus, a substantia nigra és a thalamus sejtjein mutatták ki (Hollopeter és munkatársai, 2001).

2.4. P2Y₁₂ receptor és fájdalom kapcsolata

A P2Y₁₂ receptor fájdalomban betöltött szerepéről szóló első tanulmányok a 2000-es évek második felében készültek (Kobayashi és munkatársai, 2006; Kobayashi és munkatársai, 2008; Tozaki-Saitoh és munkatársai, 2008). Az egyik első állatkísérletes munka kimutatta, hogy neuropátiás fájdalom patkány modelljében - ami ülőideg részleges lekötése volt (PSNL) - a gerincvelői mikrogliá sejtéken a P2Y₁₂ receptor mRNS expresszió fokozódik. Kimutatták továbbá, hogy egy P2Y₁₂ antagonistá (MRS2395), illetve a receptor antiszensz oligonukleotid kezelés következtében az állatokban csökkent a mechanikus allodynia illetve a termális hiperalgécia mértéke (Kobayashi és munkatársai, 2008). Egy másik kutatócsoport is hasonló eredményeket kapott, ők bal oldali lumbális L5 gerincvelői ideg szoros lekötését követően a P2Y₁₂ receptor mRNS szintű felülregulációját tapasztalták, és P2Y₁₂ antagonistá cangrelor, illetve clopidogrel alkalmazása csökkentette a mechanikus allodyníát (Tozaki-Saitoh és munkatársai, 2008). Ez utóbbi tanulmányban beszámoltak arról is, hogy P2Y₁₂R génkiütött egerek a vad típustól eltérő, enyhébb allodyníát mutattak az ülőideg lekötését követően.

A P2 ligandok fájdalomcsillapító hatását saját kísérleti adataink is alátámasztják. Kutatócsoportunk 2010-ben közölt tanulmánya szerint a P2Y₁₂ receptorantagonista MRS2395 hatékony fájdalomcsillapítónak bizonyul neuropátiás és gyulladákos fájdalommodellben valamint akut, termális fájdalomban is (Ando és munkatársai, 2010).

Összegezve az irodalmi adatokat elmondható, hogy a P2Y₁₂ receptor fájdalomban betöltött szerepe még nem teljesen tisztázott. A szakirodalomban eddig csak neuropátiás fájdalom vonatkozásában vizsgálták a P2Y₁₂ receptort, valamint a vizsgálatokban használt antagonisták nem voltak szelektívek a receptorra. Ezen túlmenően a fájdalomcsillapítás lehetséges mechanizmusa sem egyértelmű. Az imént említett okok indokolják a P2Y₁₂ receptor különböző típusú fájdalomban való részvételét igazoló további vizsgálatát.

3. Célkitűzések

A bevezetésben felsorolt szakirodalmi háttér arra enged következtetni, hogy a P2Y₁₂ receptornak a fájdalomtranszmisszióban jelentős szerepe van. Kísérletsorozatunkban a P2Y₁₂ receptor szerepét kívántuk tisztázni több különböző fájdalommodellben és szelektív, potens antagonistá vegyület, illetve a génkiütés hatását vizsgálva. Vizsgálataink az alábbi kérdésköröket érintették:

3.1. P2Y₁₂ receptorgátlás vizsgálata a fájdalom különböző állapotmodelljeiben

Ezekben a vizsgálatokban különböző P2Y₁₂ receptorantagonista ligandok hatását vizsgáltuk meg fájdalommodellekben, melyek a következők voltak:

3.2.1: CFA indukált gyulladásos fájdalom

3.2.2: Akut termális nocicepció

3.2.3: Ülőideg részleges lekötése

A farmakológiai megközelítés eredményeinek megerősítése érdekében a felsorolt modellek mindegyikében megvizsgáltunk génkiütött állatokat is.

3.2. P2Y₁₂ receptor antagonisták farmakológiai aktivitásának felmérése

A vizsgálatok során P2Y₁₂ receptorantagonisták forskolin illetve isoproterenol indukálta cAMP szintre gyakorolt hatását mértük 2-MeSADP gátló hatásával szemben.

3.3. A P2Y₁₂ receptor gátlással okozott hatások háttérmechanizmusainak felderítése

A vizsgálataink első részében kapott hatások lehetséges mechanizmusait molekuláris biológiai technikák alkalmazásával derítettük fel.

3.3/a: Kvantitatív Real-Time PCR-rel vizsgáltuk a P2Y₁₂ receptor mRNS szint változását, ELISA és FACS módszerrel az IL-1 béta expressziót, luminex-platform segítségével multiplex citokin mérést végeztünk el perifériás szövetben és a központi idegrendszerben, annak érdekében, hogy meghatározzuk az

intraplantáris CFA által indukált gyulladásos citokinek mennyiségét a gyulladt talpban és a gerincvelőben.

3.3/b: Farmakológiai blokádot és műtéti denervációt követően az előző pontban leírt modell szerinti (CFA, illetve kontroll csoport) gyulladásos citokin szintek változását vizsgáltuk, hogy a P2Y₁₂ receptor gyulladásos folyamatokban betöltött szerepét tisztázzuk.

3.4. P2Y₁₂ receptor antagonisták esetleges mellékhatásainak vizsgálata

Kísérleteinkben megvizsgáltuk az általunk használt antagonisták mozgás koordinációra, valamint trombocita aggregációra gyakorolt hatását az alábbi tesztekkel:

3.4.1: Rotarod teszt

3.4.2: *Ex vivo* trombocita-aggregációs vizsgálat

4. Anyagok és módszerek

4.1. Kísérleti állatok

Kísérleteinket az NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals szerint, az MTA KOKI Állatkísérleti Etikai Bizottságának jóváhagyásával végeztük (engedély száma: 22.1/3671/003/2008). Vizsgálatainkat 5-7 hetes korú (200-250g súlyú) hím Wistar patkányokon, valamint 60 - 70 napos korú (25-30g súlyú), P2Y₁₂ receptor génkiütött C57/Bl6 háttérű hím egereken illetve ezek kontrolljaként C57/Bl6 egereken végeztük el. A kísérleti állatokat az MTA KOKI Orvosi Géntechnológiai Részlegében (OGR) tenyésztik, SPF (Specific Pathogen Free) körülmények között. Az eredeti B6;129-P2ry₁₂^{tm1Dgen}/H egereket a Deltagen-től szereztük be. A génkiütött egereket - a P2Y₁₂ receptort kódoló génbe- LacZ és neomicin inzercióval hozta létre a gyártó. Rederivációt követően a mutáns állatokat C57/Bl6/J állatokkal kereszteztük az MTA KOKI Orvosi Géntechnológiai Részlegében (OGR). Heterozigóta tenyészpárok összerakásával hoztunk létre homozigóta génkiütött (KO) egereket és azok vad típusú (WT) alomtársait. A KO és WT egerek nem különböznek számottevően (termékenység, méret, életképesség, alapvető viselkedés jegyek, hosszúság, súly, szervek mérete) tekintetében, ami a forgalmazó adatbázisával egybevágó adat (<https://deltaone.deltagen.com>).

Az állatokat legalább 1 héttel a kísérlet kezdete előtt elkülönített ketrecekben helyeztük el, és folyamatos megfigyelés alatt tartottuk. A fájdalomkísérleteket elkülönített állatszobában, izolált körülmények között végeztük. Az állatok tartása standard körülmények között, 23±2°C-os hőmérsékleten, 60±10%-os páratartalommal, 12 órás sötét-világos ciklusban történt, táplálék és vízfelvétel ad libitum volt. A műtéteket az erre kialakított kisállat műtőben végeztük el. A beavatkozások után szoros utánkövetéssel az állatokat egyenként helyeztük el a ketrecekben felépülésükig, illetve a viselkedésvizsgálat kezdetéig.

4.2. Kezelések

Kísérleteinkben az antagonisták megfelelő dózisait intraperitoneálisan (ip.) adtuk 100-200 µL végtérfogatban 30 perccel a mérések előtt. A PSB0739, szelektív P2Y₁₂ antagonistá esetében a gyártótól kapott információ alapján tudjuk, hogy a vegyület nem

jut be a központi idegrendszerbe, ezért ezt a vegyületet intrathecálisan (it.) adagoltuk Mestre és munkatársai (Mestre és munkatársai, 1994) által leírt metodika alapján. Ekkor 5 µL végtérfigatban adtuk az antagonistá megfelelő dózisait 15 perccel a mérés előtt.

A kísérletek során az alábbi hatóanyagokat használtuk:

cangrelor (The Medicines Company, Parsippany, NJ USA)

clopidogrel hydrochloride (Sanofi-Aventis Magyarország)

6-OHDA (Sigma-Aldrich)

MLA (Sigma-Aldrich)

MRS2395 (Sigma-Aldrich)

reactive blue 2 (Sigma-Aldrich)

morphine hydrochloride (TEVA Magyarország)

ticlopidine hydrochloride (Tocris)

suramin hexasodium (Bayer Németország)

PSB-0739 Y. Baqi és K. Müller által szintetizált (Baqi és Müller, 2007, 2010; Baqi és mtsai, 2009)

forskolin, isoprenaline (Sigma-Aldrich)

A hatóanyagokat steril fiziológiás sóoldatban, illetve steril desztillált vízben oldottuk fel, kivéve az MRS2395-t és clopidogrelt, amiket DMSO és PEG 3:1 arányú elegyében, illetve a forskolint DMSO és etanol 1:7 arányú elegyében oldottuk fel. Ezekben a kísérletekben oldószeres kontroll csoportot is vizsgáltunk. Az oldatokat frissen, a kísérlet napján állítottuk elő.

4.3. Fájdalommodellek

4.3.1. Akut termális fájdalom

Az akut termális fájdalomküszöböt emelkedő hőmérsékletű hot plate analgéziaméterrel (IITC, Woodland Hills, CA, USA) mértük az Almási és munkatársai által leírt módszer

szerint (Almasi és munkatársai, 2003). A kísérleti állatokat egyenként 25°C hőmérsékletű talapzatú, plexi vizsgálókamrában helyeztük el, 10 perc akklimatizáció után a fém aljzat hőmérsékletét 6°C/perc sebességgel folyamatosan emeltük. A termális fájdalomküszöb (PWT, paw withdrawal threshold) megjelenésének az első alkalommal, bármely végtagon megfigyelhető végtagnyalogatást vagy elrántást tekintettük, ekkor a kísérletet leállítottuk és az aljzat hőmérsékletét manuálisan regisztráltuk. Valamennyi állaton kondicionáló mérést követően két kontrollmérést végeztünk 30 perces időközönként, ezek átlagát tekintettük kontroll értéknek. A kiválasztott hatóanyagokat a következő teszt előtt 30 perccel ip. injektáltuk a kísérleti állatokba 100-200 µL végtérfogatban. A termális fájdalomküszöb értéket, melyet °C-ban fejeztünk ki, az azonos állatban mért kontroll értékhez viszonyítottuk. A kísérletek egy részében a hatóanyagot (PSB0739) intrathecalisan (it.) adagoltuk, 15 perccel az analgészia mérést megelőzően.

4.3.2. CFA indukált gyulladásoos fájdalom

A kísérleti állatok jobb hátsó végtagjának plantaris felületébe komplett Freund adjuvánst (CFA, Sigma) injektáltunk (50% oldat 100 µL/patkány, 30 µL/egér). Az egerek CFA kezelését isoflurános enyhe bódításban végeztük el. A kezelés előtt és 48 óra elteltével, illetve a kísérletek egy részében 96 órával a CFA injekciót követően mechanikus végtagelrántási küszöbértéket mértünk von Frey módszerrel a kezelt és az ellenoldali végtagokon. A mérést Ugo Basile Dynamic Plantar aesthesiometerrel végeztük (von Frey, Stoelting, Woods Dale, IL, USA). A kísérleti állatokat a mérőrekeszbe helyeztük és 15 perc akklimatizációs idő után növekedő intenzitású mechanikus stimulusokkal (0-50 g) ingereltünk a kezelt és az ellenoldali lábbon. Az elrántási küszöbértéket (PWT) g-ban fejeztük ki. A további vizsgálatokba az allodynias küszöbértéket (> 30%) elérő állatokat vontuk be. A mechanikus allodynia mellett a gyulladt végtag térfogatnövekedését - ödémáját is megmértük plethysmometer segítségével (Ugo Basile plethysmometer, Stoelting, Wood Dale, IL, USA), melyet a CFA előtt mért térfogatérték százalékában fejeztünk ki. Kontrollként a kezeletlen végtag mechanikus elrántási küszöbértékét és térfogatát is lemértük. A kiválasztott antagonistákat a következő teszt előtt 30 (ip.) illetve 15 (it.) perccel injektáltuk a kísérleti állatokba

4.3.3. Neuropátiás fájdalommodell

A kísérleteket Seltzer és munkatársai által leírt módszer szerint végeztük (Seltzer és munkatársai, 1990), 250-300 g hím Wistar Patkányokon, illetve 60 napos korú egereken. A kísérleti állatokat ketamin 50 mg/kg + xylazin 50 mg/kg ip. kombinációjával altattuk el. Az állat jobb oldali nervus ischiadicus törzs feltárását követően a felső harmadban az idegtörzs 1/2-1/3-t gondosan szeparáltuk. Ezt követően teljes lekötést végeztünk szilikonizált selyemvarrattal (Ethicon 7.0), majd a sebet bezártuk. A műtétet követően az állatokat puha alommal ellátott ketrecekben helyeztük el és folyamatosan monitoroztuk a posztoperatív periódusban. Szükség esetén a sebet altatás mellett ismét bezártuk, illetve az állatokat szeparáltan helyeztük el. A beavatkozást megelőzően, illetve az azt követő 7. napon mechanikus végtagelrántási küszöbértéket mértünk von Frey módszerrel a műtött és az ellenoldali végtagokon, a fent leírt módszer szerint. A további vizsgálatokba az allodyniás küszöbértéket (> 30%) elérő állatokat vontuk be. A kiválasztott antagonistákat a következő teszt előtt 30 (ip.) illetve 15 (it.) perccel injektáltuk a kísérleti állatokba.

4.4. Mellékhatás vizsgálatok

4.4.1. Rotarod teszt

A kísérletekben 140-190g közötti testtömegű, hím Wistar patkányokat használtunk. A mozgáskoordinációt az IITC (Woodland Hills, CA, USA) Rotarod készülékkel mértük, melyen egyszerre 5 patkány vagy egér párhuzamosan vizsgálható. Az apparátus 5 rekeszre elválasztott 8-, illetve 4 cm átmérőjű forgórúdból áll, amely 25 cm-el az alapzat felett van felszerelve. Az állatok mozgáskoordinációját 300 sec periódusokban teszteltük, emelkedő sebességű forgórúddal (5 rpm - 25 rpm). A kísérletet megelőzően 2 napon át tartó tréning periódusnak tettük ki az állatokat, melynek során mindkét nap, naponta 3 alkalommal, egyenként 300 sec időtartamban helyeztük az állatokat a forgórúdra. Ezt követően a tesztnapon, 30 perccel a kezelés előtt egy 300 secundumos tesztperiódus során felvettük a leesési látencia alapértékét. Azokat az állatokat, amelyeknél 60 sec alatti látenciát mértünk, kizártuk a vizsgálatból. Ezt követően az

állatokat fiziológiás sóoldattal, illetve a kiválasztott ligandokkal kezeltük ip. (3 mg/kg cangrelor/só), illetve it. (0.3 mg/kg PSB-0739/só). Az ip. kezelést követően 30 perccel, illetve az it. kezelést követően 15 perccel ismét lemértük a látenciát egy újabb 300 másodperces tesztperiódusban. A látencia idejét másodpercben fejeztünk ki.

4.4.2. *Ex vivo* trombocita aggregáció mérése

Ezekben a kísérletekben 200-250 g súlyú hím Wistar patkányokat használtunk a KOKI Orvosi Géntechnológiai Részlegének tenyészetéből. Az állatokat ip./it. kezeltük a hatóanyagokkal, illetve fiziológiás sóoldattal, majd 30, illetve 15 perccel a kezelést követően az állatokat ketamin 50 mg/kg + xylazin 50 mg/kg ip. kombinációjával elaltattuk, és 3 ml vért vettünk a szívből, 3,8%-os nátrium-citrát tartalmú Vakutainer-csővekbe. A mintákat 150 g-n 8 percig centrifugáltuk, majd a thrombocytadús felülúszót (Platelet Rich Plasma, PRP) óvatosan eltávolítottuk. Ezt követően a maradék mintákat - thrombocytaszegény plazma (Platelet Poor Plasma, PPP) nyeréséhez - ismételtelen centrifugáltuk (2500 g-n, 8 percig). A mérésekhez használt küvetkába 450-450 µL PRP-t, illetve PPP-t pipettáztunk, majd a vérlemezkék aggregációját 50 ml ADP (5 µM és 10 µM), kollagén (2 µg/ml), illetve ristocetin (10 µg/ml) hozzáadásával indukáltuk. Vizsgálatainkat a Born-féle turbidimetriás elven működő (Born, 1977) Carat TX-4 (Carat Diagnosztika Kft., Budapest) négycsatornás thrombocyta-aggregométerrel végeztük. Az individuális különbségek kiküszöbölésére a készülék tárolja a thrombocytadús és thrombocytaszegény plazmák fényáteresztő képességét (PRP: 0%, PPP: 100%), majd az induktorokkal kiváltott aggregáció mértékét a PPP-PRP optikai sűrűség különbségéhez viszonyítva számolja. A szuszpenzió fényáteresztő képessége az aggregáció mértékével párhuzamosan nő, ezt a műszerhez kapcsolt számítógép programja ábrázolja. Az így nyert görbéből a maximális aggregáció értékét vettük figyelembe, amelyet a maximális fényáteresztő képesség 100%-ban fejeztünk ki. A mérés 10 perces időtartama alatt 37 °C-os inkubációt és folyamatos mágneses keverést (1000 rpm) alkalmaztunk. A minták vizsgálata validált körülmények között a vérvételt követő 2 órán belül történt a Semmelweis Egyetem Pentacore Laboratóriumában (1083 Budapest, Korányi Sándor u. 2./a).

4.5. cAMP mérés

A transzfektált sejtvonalakon történő vizsgálatok kollaborációs partnerünk (Prof. Ivar von Kügelgen, Department of Pharmacology and Toxicology, University of Bonn, Germany) laboratóriumában történtek. A vizsgálatokban 1321N1 astrocytoma sejtvonalakat (amelyek humán P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄ receptort expresszálnak), illetve kínai hörcsög ovárium (CHO Flip-In) sejteket (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) használtak. A sejteket humidifikált 5% CO₂ /95% levegő atmoszférában, Glutamax I (35050-038, Invitrogen, Karlsruhe, Germany), L-Glutamine (M11-004, PAA, Pasching, Austria) és 10% foetal bovine szérummal (FBS; 10108-165, Invitrogen, Karlsruhe, Germany, vagy A15-101, PAA, Pasching, Austria) kiegészített Dulbecco's modified Eagle's medium-ban (DMEM, 419660-029, Invitrogen, Karlsruhe, Germany, 1321N1), illetve Ham's F₁₂ medium-ban (Invitrogen, Karlsruhe, Germany, CHO) tenyésztették 36.5 °C-on. A sejteket hetente 1x osztották és hetente 2x passzálták új edényekbe (Sarstedt, Nürnberg, Germany). A szeparációhoz trypsin-EDTA-t (trypsin 0.5 g/l, EDTA 0.54 mM; 25300-054, Invitrogen, Karlsruhe, Germany, vagy L11-660, PAA, Pasching, Austria) használtak. Az intracelluláris cAMP akkumulációt korábban publikált módszerek szerint mérték (Hoffmann és munkatársai, 2009; Hoffmann és munkatársai, 2008). A 1321N1 sejteket 24 lyukú plate-re vitték fel és 48 óra múlva, a médium eltávolítását követően 20 mM HEPES-t tartalmazó (Sigma, Deisenhofen, Germany; pH 7.3) HBSS pufferben 2 órán át inkubálták 36.5 °C-on. A sejteket ezt követően 10 nM isoproterenollal illetve 10 μM forskolinnal stimulálták, 36.5 °C-on, 10 percig, a P2Y₁₂ receptor agonista 2-meSADP (0.01-100 nM) jelenlétében, illetve hiányában. Az antagonistákat 10 perccel az agonista adás előtt adták. 10 perccel az agonista adást követően a reakciót a médium eltávolításával és lizáló oldat hozzáadásával (500 μl; 90 °C; Na₂EDTA 4 mM; Triton X100 0.1%, Sigma, Deisenhofen, Germany, pH 7.5) terminálták.

A szupernatánsban megjelenő cAMP szintet ezt követően a kísérletek egy részében cAMP binding protein, valamint [³H]-cAMP (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) hozzáadását követően folyadék szcintillációs spektrometriával mérték, a nem kötött cAMP eltávolítását követően.

A CHO sejteken a cAMP választ Cre-függő luciferáz assay segítségével mérték: a sejteket pCRE-luc vektorral (Stratagene, Amsterdam) és Lipofectamine 2000 (Invitrogen) segítségével tranziensen transzfektálták, majd 18 órát követően 24 lyukú plate-re ültették ki őket. A kísérletet a fent leírt módon folytatták, majd a reakciót 50 μ L HBSS és 50 μ L Bright-GLO luciferáz assay (Promega) oldat hozzáadásával terminálták. A szupernatáns luciferáz aktivitását luminométerrel mérték le (Bethold Technologies, Bad Wildbad, Germany).

A cAMP szinteket regresszió analízis segítségével számolták ki, standard kalibrációs görbe segítségével, és az isoproterenol/forskolin jelenlétében, de 2-meSADP hiányában mért érték százalékában fejezték ki (%). A kapott adatokból gátló agonista koncentráció-hatásgörbéket vettek fel és nem lineáris regresszió analízissel meghatározták az egyes görbékhez tartozó IC_{50} értékeket. Ezt követően, Arunlakshana és Schild módszerével (Arunlakshana, Schild, 1997) határozták meg az antagonisták K_b és pA_2 értékét, a $pKB = \log(\text{dose ratio} - 1) - \log[B]$, és a $pA_2 = -\log K_b$ összefüggések felhasználásával.

4.6. Szubdiafragmatikus vagotómia (VGX)

A kísérletekben 200-250 g súlyú hím Wistar patkányokat használtunk a KOKI Orvosi Géntechnológiai Részlegének tenyészetéből. A vagotómiát Andrews és munkatársai által leírt módszer szerint végeztük el (Andrews és munkatársai, 1985). Ketamin-xylazinos altatást követően (Ketamin 50 mg/kg, Xylazin 50 mg/kg) 3-4 cm ventrális abdominális középvonali vágást ejtettünk az állaton. A májat óvatosan jobb oldal felé húztuk, hogy elkerüljük a szerv sérülését, majd megkerestük a gyomorszájat, mint kiindulási pontot. Ezt követően a nyelőcsövet és a gyomrot óvatosan kaudális irányba húztuk. Műtéti mikroszkóp segítségével megkerestük a bolygóideget (*n. vagus*). A bolygóideg körülbelül 1.5 cm-es darabjait eltávolítottuk anterioralisan és posterioralisan egyaránt. Ezt követően a sebet bezártuk, az állatoknak szubkután 10 mL fiziológiás sóoldatot adtunk és egyenként helyeztük el őket ketrecekben, melyeket puha aljzattal láttunk el. A beavatkozást követően az állatokat naponta felügyeltük, és ha szükséges volt, a sebeik gyógyulását segítettük tisztítással, újravarrással. Felépülésüket követően a patkányokat ismét csoportosan tartottuk a kísérletek kezdetéig. Kontrollként áloperált állatokat használtunk, melyeknél altatást követően az ülőideg feltárását elvégeztük, de

az ideget nem távolítottuk el. A végtagelrántási küszöbértékeket megmértük közvetlenül a műtét előtt és egy héttel a beavatkozás után (műtét hatását mértük meg az állatokon), a posztoperatív PWT mérést követően intraplantáris CFA kezelést kaptak az állatok, majd két nap múlva megmértük a CFA által kialakult hiperalgéziát, illetve az egyes antagonisták hatásait.

4.7. Molekuláris biológiai vizsgálatok

4.7.1. Kvantitatív Real-Time PCR P2Y₁₂R mRNS expressziójának vizsgálatára

A kísérletekben 200-250 gramm közötti hím Wistar patkányokat használtunk a KOKI OGR tenyészetéből. A patkányok jobb hátsó végtagjának plantaris felületébe CFA-t injektáltunk (100 µL 50% oldat, Sigma, Complete Freund's adjuvant). 48h elteltével a kísérleti állatokat feláldoztuk, majd szárazjégen RNS izolációra mintát vettünk az ödémás talpból és a gerincvelő lumbális (L4-L5) szakaszából. Kontrollként intraplantáris sókezelt állatok talp- illetve gerincvelő mintáit használtuk. A P2Y₁₂ receptort kódoló gén expressziójának mennyiségi változását Real-Time PCR technikával vizsgáltuk. A mintákat Trizolban homogenizáltuk és lizáltuk, majd teljes RNS-t izoláltunk RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Quiagen) segítségével a gyártó utasításának megfelelően. Az így kinyert RNS-en reverz transzkripciót végeztünk RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Vilnius, Lithuania) felhasználásával korábban leírt módszerünk szerint (Papp és munkatársai, 2004): 2 µg teljes RNS-t és 1 µL RevertAid H Minus M-MuLV reverz transzkriptázt 5 µL reakcióeleggyé kevertünk, melyhez 5x reakció puffert, 1 µL random hexamer primert (10 pmol/µL), 1 µL of RiboLock™ RNase Inhibitor (20 u/µL), és 2 µL 10 mM dNTP mixet adtunk, 20 µL végtérfogatig, 0.1% diethylpyrocarbonate-kezelt desztillált vízzel. A reverz transzkripciót 70 °C-on 5 percig végeztük, majd 25 °C-on 5 percig inkubáltuk a mintát, ezt követően 10 percig 25 °C-on, majd 60 percig 42 °C –on folytattuk az inkubációt, végül a mintákat –20 °C-on tároltuk. A génexpresszió szintjét a cDNS mintákban kvantitatív Real-Time PCR (Rotor-Gene 3000; Corbett Research, Sydney, Australia) segítségével határoztuk meg. A Real-Time PCR reakcióhoz LightCycler DNA Master SYBR Green I Kit (Roche, Indianapolis, IN, USA) felhasználásával standard protokollt használtunk. A PCR kondíciókat a primerekhez, a templáthoz és MgCl₂-hoz optimalizáltuk. Az amplifikációhoz a következő protokollt használtuk:

- kezdeti denaturáció: 95 °C, 5 perc,
- hot start: 80 °C,
- 40 ciklus: 94 °C, 1 perc; 59 °C, 1 perc; 72 °C, 1 perc;
- végső extenzió 72 °C, 5 perc.

A P2Y₁₂ receptor primer szekvenciái a következők voltak:

CAGGTTCTCTTCCCATTGCT (forward primer)

CAGCAATGATGATGAAAACC (reverz primer)

5'-GTAACC CGTTGAACCCATT (18S forward primer)

3'-CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG (18S reverz primer)

Az adatfeldolgozás során, hogy megbizonyosodjunk a reakció specificitásáról és pontos kvantifikációjáról, minden reakciót követően olvadásgörbe analízist végeztünk, mellyel kizárhatóak a primer–dimer műtermékek és kontaminációk. A Ct értékeket a Rotor Gene 5 software (Corbett Research, Sydney, Australia) segítségével számoltuk ki. A target gének expressziós szintjét a referencia gén (18S rRNS) expressziójára normalizáltuk. A target gén és a referencia gén expresszióját mindig azonos kísérletben vizsgáltuk. A target gének kifejeződésének összevetését a különböző kísérletek közt a Pfaffl modell segítségével végeztük (Pfaffl, 2001). Az eredményeket normalizált expresszió ± SEM formában adtuk meg.

4.7.2. Interleukin 1-béta expresszió mérése ELISA módszerrel

A kísérleteket 200-300 g súlyú hím Wistar patkányokon, illetve 25-30 g súlyú hím egereken végeztük el random kiválasztott 3-4 elemszámú csoportokban. A kísérleti állatok jobb hátsó végtagjának plantaris felületébe komplett Freund adjuvánst (CFA, Sigma) injektáltunk (100 µL 50% oldat) és 48, illetve 96 óra elteltével az állatokat leölését követően szárazjégen mintát vettünk a gyulladt talpból és a gerincvelő lumbális (L4-L5) szakaszából. Kontrollként intraplantárisan sókezelt állatok talp- és gerincvelő mintáit használtuk. A kísérletek egy részében szisztémás 6-hidroxi dopaminnal szimpatikus denerváló kezelést alkalmaztunk (kétnaponta: 40 mg/kg-60 mg/kg-60 mg/kg 6-OHDA, 0.1 % aszkorbinsav tartalmú fiziológiás sóoldatban), Lorton és

munkatársai által közölt metodika szerint (Lorton és munkatársai, 1999). A szövetmintákat 500 μ L 10 mM Tris-HCl pufferben homogenizáltuk, amely 1 mM EGTA-t, 1 mM EDTA-t, 0.2mM PMSF-t és 4M ureát tartalmazott 0.1 g szövetenként. A kiinduló szövetmennyiség kb. 80 mg volt. A mintákat 4°C-on, 20 percig, 15.000 g-n centrifugáltuk, majd a felülúszót 500 μ L 10 mM Tris-HCl pufferben gyűjtöttük össze, amely 1% BSA-t és 0.2% Tween 20-t tartalmazott. Az IL-1 β produkciót az egér és patkány IL-1 β -ra specifikus, DuoSet IL-1 β (R&D System, Minneapolis, MN, USA) ELISA kittel határoztuk meg, a gyártó utasításának megfelelően, mely a pro-

IL-1 β és az érett citokin szintjét egyaránt detektálja. Az assay detekciós limitje <5 pg/ml volt. Az abszorbanciát 450 nm-nél olvastuk le, Perkin-Elmer Victor3V 1420 Multilabel Counter segítségével. A méréseket triplikátumban végeztük. A CFA és egyéb kezelések hatását az IL-1 β produkcióra pg/ml-ben fejeztük ki.

4.7.3. Multiplex citokin mérés Luminex platform segítségével

A kísérleteket 200-250 g súlyú hím patkányokon végeztük n=5 elemszámú csoportokban. A kísérleti állatok jobb hátsó végtagjának plantaris felületébe CFA-t (Complete freund's adjuvant, Sigma, 100 μ L 50% oldat), illetve fiziológiás sóoldatot injektáltunk. A kísérleti állatokat a CFA injekció után 48, illetve 96 órával a kiválasztott ligandokkal kezeltük. A mechanikus hiperalgésia és a gyulladt végtag térfogatnövekedésének meghatározását követően az állatokat antagonistával kezeltük: cangrelort (30 mg/kg) 30 perccel ip. injektáltuk, míg a PSB0739-t (0.3 mg/kg it.) 15 perccel az ismételt méréseket megelőzően adtuk a kísérleti állatokba, majd a mérések után dekapitáltuk az állatokat. A gyulladt perifériás szövetet, illetve a gerincvelő lumbális (L4-L6) szegmenseit szárazjégen kiperaráltuk és -70 °C-on tartottuk a további feldolgozásig. A vizsgált gyulladásoos citokinek (interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), TNF- α és az anti-inflammatorikus citokin interleukin-10 (IL-10) szintjét a szövetmintákban az R&D Systems mikrogyöngy-alapú Fluorokine® MultiAnalyte Profiling kitjeinek felhasználásával Luminex-xMAP multiplex platformon határoztuk meg. A szövetmintákat 500 μ L 10 mM Tris-HCl pufferben homogenizáltuk, amely 1 mM EGTA-t, 1 mM EDTA-t, 0.2mM PMSF-t és 4M ureát tartalmazott 0.1 g szövetenként. A kiinduló szövetmennyiség körül-belül 80 mg volt. A mintákat 4°C-on, 20 percig, 15.000 g-n centrifugáltuk, majd a felülúszót 500 μ L 10 mM Tris-HCl

pufferben gyűjtöttük össze, amely 1% BSA-t és 0.2% Tween 20-t tartalmazott. A méréseket 96 lyukú filter microplate-en végeztük. A citokin mérések protokollja szerint a panelspecifikus alapkit Rat Fluorokin MAP Base Kit, Panel A mellett, (amely tartalmaz minden nem analitikum-specifikus reagenst) analitikum specifikus mikrogyöngy szett (coated microbead+biotinylated 2nd step antibody) felhasználásával történt a citokinek mennyiségi meghatározása. A citokin assay-ek esetében duplikálva felmért BLANK, St1.....St7 mérési helyek mellett 80 szabad mintahelyen, 40 mintát mértünk duplikálva. A 4-plexes mérés keretében egy mintában egyszerre határoztuk meg a négyféle citokint. A citokinek gyártási számai és a gyártó által garantált detekciós limitjei a következők voltak: IL-1 β : LUR501, 16.6 pg/ml, IL-6: LUR506, 71.3 pg/ml, IL-10: LUR522, 11.6 pg/ml, TNF- α : LUR510, 19.5 pg/ml. A mérések kivitelezése a SE Fluoreszcens Technikák Közös Használatú Laboratóriumában (Simmelweis Egyetem, Elméleti Orvostudományi Központ, Klinikai Kísérleti Kutató- és Humán Élettani Intézet, 1094 Budapest, Tűzoltó utca 37-47) történt, a Biomedica Hungária Kft. által betanított szakember közreműködésével. A CFA és egyéb kezelések hatását a citokin produkcóra abszolút értékben (pg/ml) fejeztük ki.

4.7.4. Citokin mérés FACS segítségével

Az állatok terminálását követően a jobb hátsó végtag talppárnájából kimetszettünk. A mintákat -80°C-on tároltuk a feldolgozásig. A protein-assayhez és citokin-méréshez a homogenizált és centrifugált minták felülúszóját használtuk (Chapman és munkatársai, 2009; Denes és munkatársai, 2010). A IL-1 β proinflammatorikus citokin koncentrációját BD Cytometric Bead Array (CBA) Flex Sets (BD Biosciences) segítségével mértük meg. Az áramlásos citometriás méréseket egy BD FACS Verse készüléken (BD Bioscience) végeztük el és a kapott adatokat az FCAP Array v5 software (Soft Flow, USA) segítségével elemeztük. A citokin koncentrációkat normalizáltuk a szövetminták teljes fehérjetartalmára, melyet fotometriás módszerrel mértünk. Ehhez Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kitet (Rockford, USA) használtunk, az abszorbanciát pedig 560 nm-en mértük egy Perkin Elmer Victor 3V 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer, USA) készülék segítségével.

4.8. HPLC analízis

A kísérleteket 200-250 g súlyú hím wistar patkányokon végeztük n=5 elemszámú csoportokban. A kísérleti állatok jobb hátsó végtagjának plantaris felületébe CFA-t (Complete freund's adjuvant, Sigma, 100 μ L 50% oldat), injektáltunk. Az injektálást megelőzően szisztémás 6-OHDA illetve fiziológias sóoldat intraperitoneális injektálását végeztük el (kétnaponta: 40 mg/kg-60 mg/kg-60 mg/kg 6-OHDA 0.1 % aszkorbinsav tartalmú fiziológias sóoldatban) Lorton és munkatársai által közölt metodika szerint (Lorton és munkatársai, 1999). A HPLC analízis során a gyulladt perifériás szövet monoamin és monoamin metabolitjainak tartalmát határoztuk meg az alábbi módszer szerint: az állatok feláldozását követően a gyulladt talpmintát szonikával homogenizáltuk 300 μ L jéghideg 0,1 M perklórsavval, mely 10 mM teofillint tartalmazott. 10 perc 4 $^{\circ}$ C-on és 3150 g-n történő centrifugálást követően 2 M KOH-ot adtunk a mintához és ismét centrifugáltuk az imént megadott paraméterekkel. A folyadékkromatográfiás rendszert a 715 operation software segítségével kezeltük (Gilson Medical Electronics inc., Middletown, and WI USA). A rendszer folyadékpumpákból, automata oszlopcserélő programozható injektorból és autoinjektorból (SIL-10AD, Shimadzu) állt. Az eluent BAS 400 típusú elektrokémiai detektorhoz kapcsoltuk (szén elektród vs. Ag/AgCl referencia elektród) az oxidációs potenciált 0.75 V Eltron potenciosztáttal tartottuk fenn. A minták dúsítása Supelcosil LC-C18 (100 x 4.6 mm) oszlopon történt RP pufferben (0.15 mM ammóniumformát puffer, 0.25 mM EDTA, pH=3.2). A szeparációhoz Supelcosil LC-C18 DB (150 x 4.6 mm) oszlopot használtunk RP pufferrel 0.6 ml/perc áramlási sebességgel. Az analízishez IP puffert használtunk (0.15 mM ammóniumformát, 0.25 mM EDTA, 0.45 mM oktán kénessav nátrium sója, 6% V/V acetonitril, pH=3.2) és 0.98 mL/perc áramlási sebességet alkalmaztunk. A koncentrációkat kétpontú kalibrációs görbe segítségével saját standard metodika szerint számoltuk, az adatokat pmol/mg protein értékben fejeztük ki.

4.9. Statisztikai módszerek

A tanulmányban szereplő összes adatot a csoport átlaga \pm szórásként tüntettük fel (S.E.M. , Standard Error of Mean) n számú megfigyelés során, ahol n az állatok illetve a megfigyelések (platek welljeinek) számát jelenti. A statisztikai elemzéskor a kezelések

összehasonlításához egyszempontú variancia analízist (ANOVA) használtunk *in vivo* és *in vitro* kísérleteink során. A csoportok összehasonlításához post hoc tesztek alkalmaztunk (Tukey illetve Neuman-Keuls teszt). Így vetettük össze a poszt CFA kezelés végtagelrántási küszöbértékeit az antagonisták és kontroll sóoldat, illetve vivőanyagok dózisainak hatásaival. Ezzel azonos módszert alkalmaztunk a neuropátiás fájdalommodell esetén (pre, és posztoperatív illetve antagonisták csoportok összehasonlítása) és a multiplex citokin mérés során is. A hot plate teszt során a pre-, illetve poszt értékeket párosított t-próbával hasonlítottuk össze. A P2Y₁₂ génkiütött egereken végzett mechanikus hiperalgéria tesztek során többszempontos, ismételt mérésű variancia analízist végeztünk (repeated measures multivariate ANOVA), ahol összehasonlítottuk a génkiütés hatását (génkiütött vs. vad típus), a kezelést (pre vs. post), valamint kontrollként az ellenoldali hatást (ipsilateral vs. contralateral). Az IL-1 β Elisa mérés során kétszempontú ANOVA-t használtunk post-hoc teszttel (Fischer LSD post hoc teszt).

A Minimális hatékony dózis (Minimal Effective Dose, MED) az a legkisebb dózis, amely képes volt szignifikáns változást okozni a posztoperatív PWT értéken, illetve a hőmérsékleti küszöbértéken. A maximális hatásnak (E_{max}) az általunk vizsgált dózis tartományban tapasztalt legnagyobb értéket tekintjük grammban vagy °C-ban kifejezve.

5. Eredmények

5.1. P2Y₁₂ receptor antagonisták antinociceptív hatásai a különböző fájdalommodellekben

5.1.1. Hot plate teszt

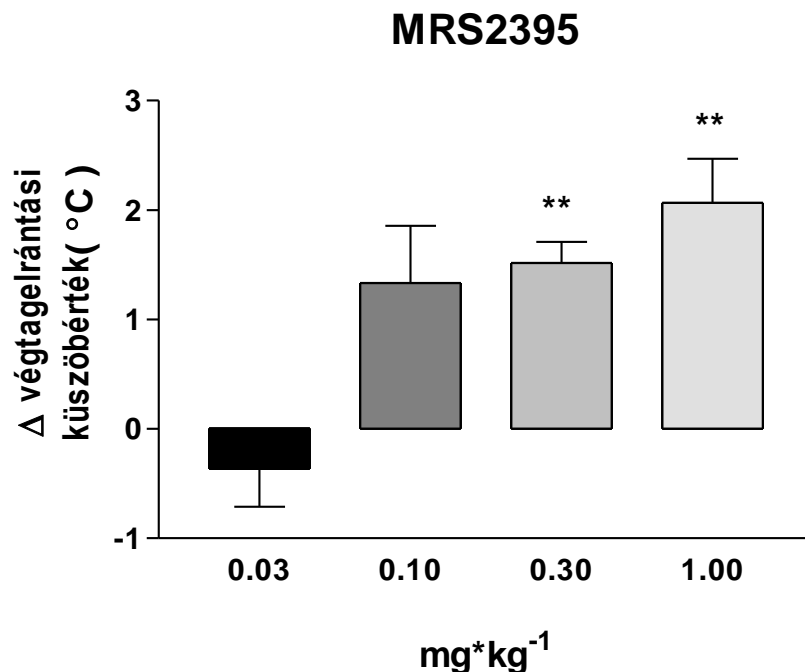
A hot plate teszt esetében a nocifenzív alapértéket meghatározó két kontrollmérés (30 perces különbséggel) átlagai 46.60 ± 0.12 °C illetve 46.84 ± 0.09 °C voltak (n=178). A referenciavegyületként használt, 10 mg/kg dózisu, intraperitoneálisan adagolt morfin erős küszöbérték emelkedést okozott az állatokban, ez 50.16 ± 1.23 °C volt (n=8, p <0.05), amely szignifikáns volt az ip. sókezelt csoportban mért 46.83 ± 0.53 °C értékhez viszonyítva (n=8). Ezek az adatok az irodalmi adatokkal és csoportunk korábban közölt adataival megegyezők (Almasi és munkatársai, 2003; Ando és munkatársai, 2010).

Ezekben a tesztekben az általunk vizsgált hat antagonisták közül négynek volt szignifikáns hatása a nocifenzív küszöbértékre. Az MRS2395 dózisfüggő fájdalomcsillapító hatást mutatott az általunk vizsgált 0.03-1 mg/kg dózis tartományban. Az általunk vizsgált legmagasabb dózis, az 1 mg/kg 2.06 ± 0.40 °C, szignifikáns fájdalomküszöb emelkedést okozott (**2. ábra**). A klinikumban is használt prodrog clopidogrel és ticlopidine is szignifikáns hatású volt. Clopidogrel esetén 0.3-10 mg/kg (ip.) dózistartományban 1 mg/kg-nál volt szignifikáns hatása először és a maximális hatást 3 mg/kg-nál érte el, ami 1.34 ± 0.39 °C, (n=6, p <0.05) (**3. ábra**). A ticlopidine legkisebb hatékony dózisa 10 mg/kg volt, a legnagyobb hatást pedig 100 mg/kg-nál mértük, ami 2.69 ± 0.58 °C küszöbhőmérséklet változás volt (Δ PWT), mely a morfin hatását megközelítő, ahhoz viszonyítva 78%-nak bizonyult. A ticlopidinet 3-100 mg/kg dózistartományban vizsgáltuk (**4. ábra**). A PSB-0739-t kétféle adagolással (intraperitoneális és intrathecalis) is megvizsgáltuk (**5. ábra**). Intraperitoneális adagolással nem tapasztaltunk hatást a vizsgált tartományban (0.003-0.3 mg/kg), intrathecalis adagoláskor azonban dózistól független, szignifikáns hatást tapasztaltunk az általunk vizsgált 0.01-0.3 mg/kg-os dózis esetén. A PSB-0739 legnagyobb hatása a legalacsonyabb dózisban volt 1.84 ± 0.52 °C (n=6, p <0.05), így a mED és Emax értékek ebben az esetben megegyeznek.

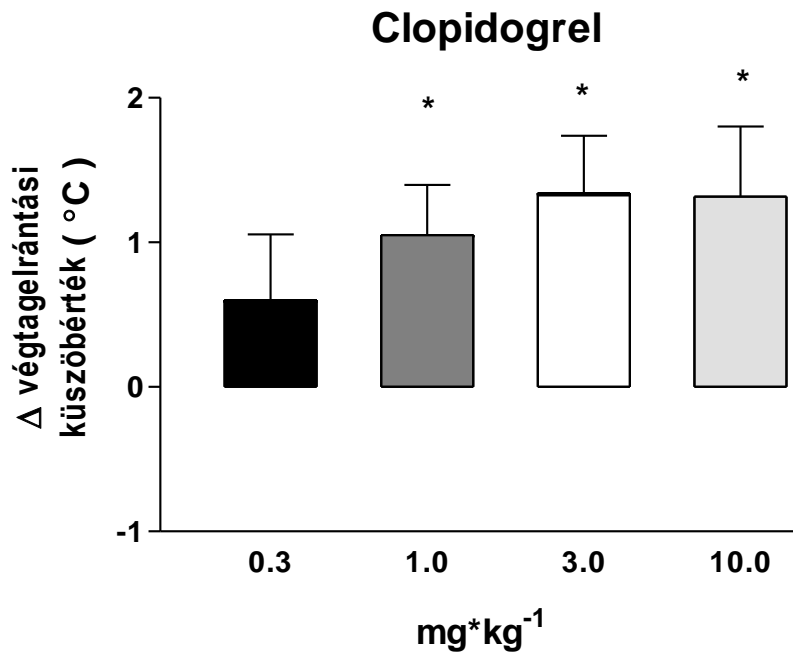
A potens P2Y_{12/13} receptorantagonista cangrelort a 0.1-1 mg/kg dózistartományban vizsgáltuk, intraperitoneális adagolással. A vizsgált tartományban a vegyületnek nem volt szignifikáns hatása (**6. ábra**).

A reactive blue 2 is hatástalannak bizonyult a tesztelt 0.3-60 mg/kg tartományban, annak ellenére, vagy éppen azért, mert számos P2Y receptort képes blokkolni (**7. ábra**). A hot plate teszt eredményeit összegezve elmondható, hogy négy antagonistának volt hatása a termális nocifenzív küszöbértékre, a hatáserősség alapján az alábbi sorrendet állíthatjuk fel:

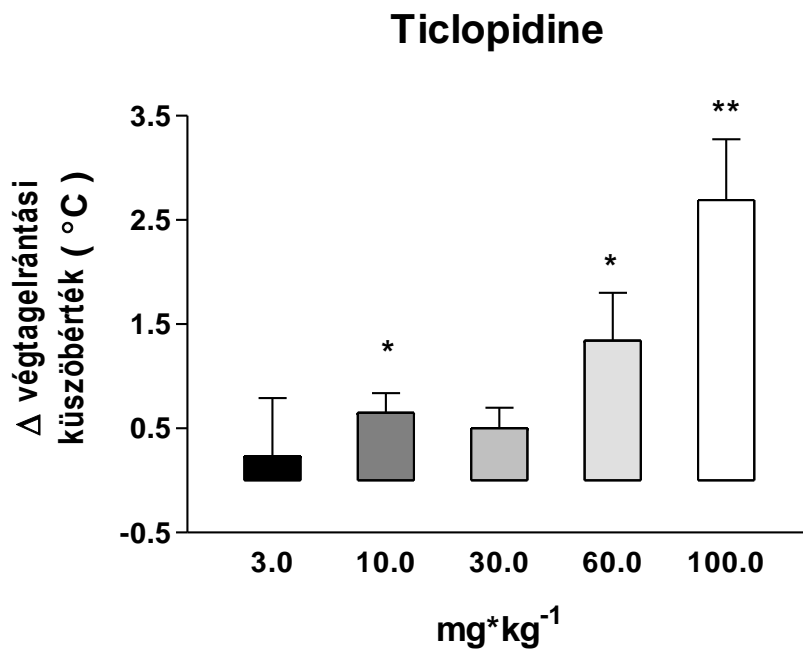
PSB-0739 (it.)> MRS2395> clopidogrel> ticlopidine



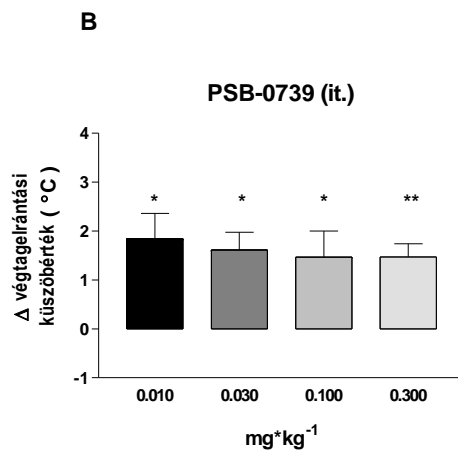
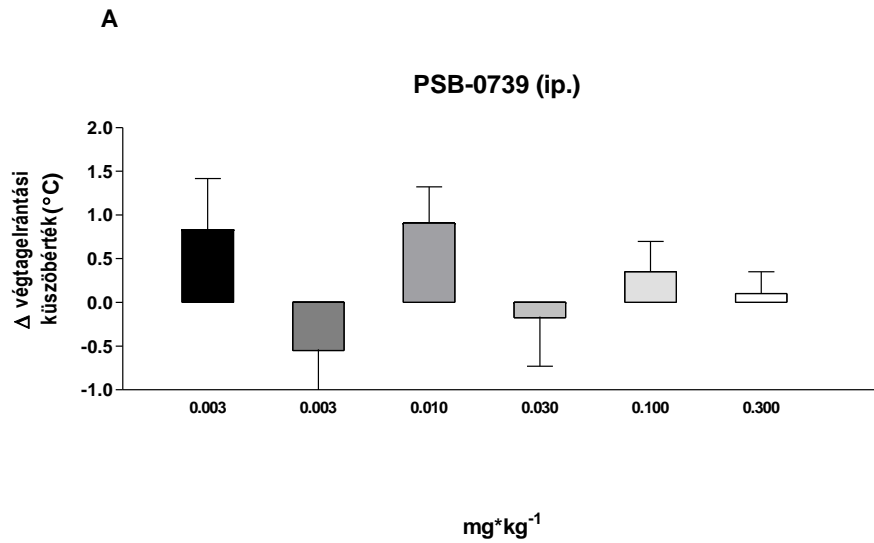
2. ábra Az MRS2395 dózisfüggő hatása a nocifenzív küszöbhőmérsékletre (PWT) a hot plate tesztben. A kísérleti állatokon 2 kontroll mérést végeztünk, majd ezt követően MRS2395-t ip. injektáltunk a feltüntetett dózisokban. 30 perccel a MRS2395 beadása után tesztmérést végeztünk. A PWT érték változását °C-ban fejeztük ki. Az MRS2395 a magasabb koncentrációkban szignifikánsan emelte a nocifenzív küszöbértéket az anyagadás előtt mért kontroll értékhez viszonyítva (n=6, **p<0.01).



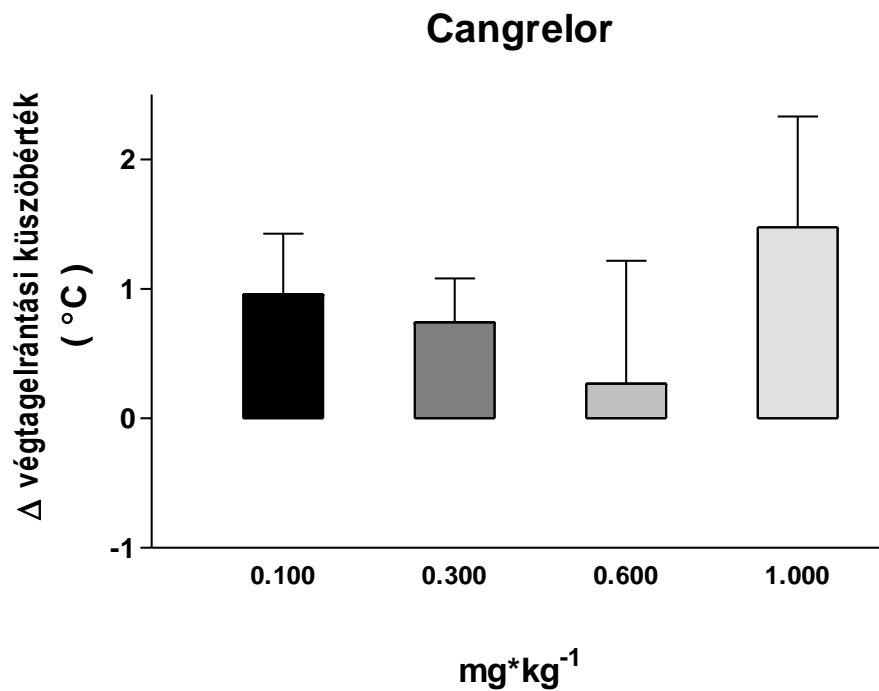
3. ábra A (+) clopidogrel dózisfüggő hatása a nocifenzív küszöbhőmérsékletre (PWT) a hot plate testben. A kísérleti állatokon 2 kontroll mérést végeztünk, majd ezt követően (+) clopidogrelt ip. injektáltunk a feltüntetett dózisokban. 30 perccel a (+) clopidogrel beadása után tesztmértést végeztünk. A PWT érték változását °C-ban fejeztük ki. A (+) clopidogrel a magasabb koncentrációkban szignifikánsan emelte a nocifenzív küszöbértéket az adagolás előtt mért kontroll értékhez viszonyítva (n=6, *p <0.05).



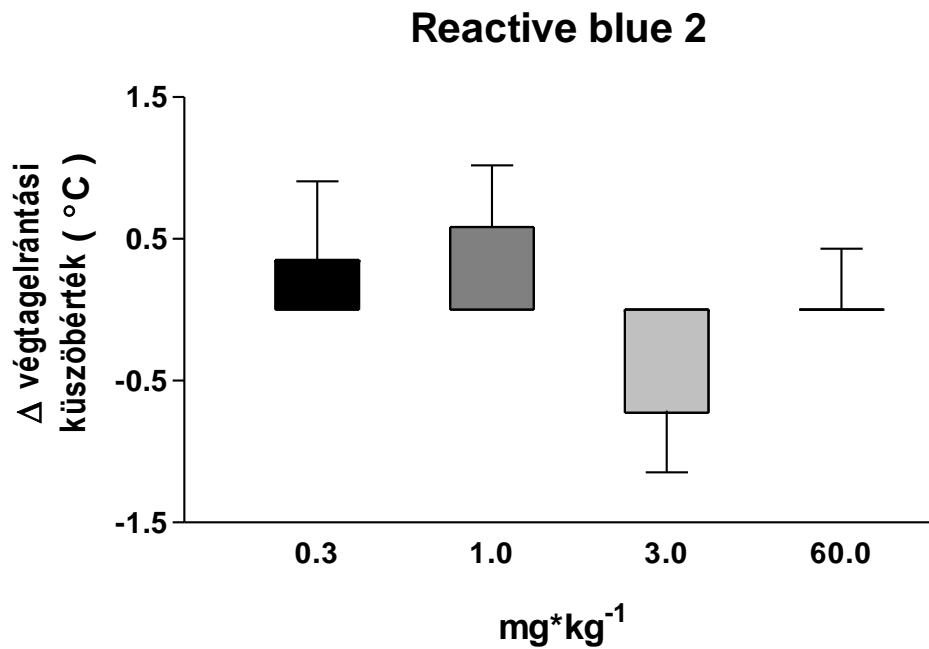
4. ábra A ticlopidine dózisfüggő hatása a nocifenzív küszöbhőmérsékletre (PWT) a hot plate testben. A kísérleti állatokon 2 kontroll mérést végeztünk, majd ezt követően ticlopidinet ip. injektáltunk a feltüntetett dózisokban. 30 perccel a ticlopidine beadása után tesztmérést végeztünk. A PWT érték változását °C-ban fejeztük ki. A ticlopidine a magasabb koncentrációkban szignifikánsan emelte a nocifenzív küszöbértéket az anyagadás előtt mért kontroll értékhez viszonyítva (n=6, *p < 0.05).



5. ábra A PSB-0739 hatása intraperitoneális (ip.) és intrathecalis (it.) adagolással a nocifenzív küszöbhőmérsékletre (PWT) a hot plate tesztben. A kísérleti állatokon 2 kontroll mérést végeztünk, majd ezt követően a PSB-0739-t injektáltunk a feltüntetett dózisokban. 30 (A), illetve 15 (B) perccel a PSB-0739 beadása után tesztmérést végeztünk. A PWT érték változását °C-ban fejeztük ki. A PSB-0739 it. adagolással szignifikánsan emelte a nocifenzív küszöbértéket az anyagadás előtt mért kontroll értékhez viszonyítva (n=6/csoport, *p <0.05, **p <0.01).



6. ábra A cangrelor hatása a nocifenzív küszöbhőmérsékletre (PWT) a hot plate testben. A kísérleti állatokon 2 kontroll mérést végeztünk, majd ezt követően cangrelort ip. injektáltunk a feltüntetett dózisokban. 30 perccel a cangrelor beadása után tesztmérést végeztünk. A PWT érték változását °C-ban fejeztük ki. A cangrelor nem befolyásolta szignifikánsan a nocifenzív küszöbértéket az anyagadás előtt mért kontroll értékhez viszonyítva (n=6/csoport).



7. ábra A reactive blue 2 hatása a nocifenzív küszöbhőmérsékletre (PWT) a hot plate tesztben. A kísérleti állatokon 2 kontroll mérést végeztünk, majd ezt követően reactive blue 2 -t ip. injektáltunk a feltüntetett dózisokban. 30 perccel a reactive blue 2 beadása után tesztmérést végeztünk. A PWT érték változását °C-ban fejeztük ki. A reactive blue 2 nem befolyásolta szignifikánsan a nocifenzív küszöbértéket az anyagadás előtt mért kontroll értékhez viszonyítva (n=6/csoport).

5.1.2. CFA indukált gyulladáshoz vezető fájdalom

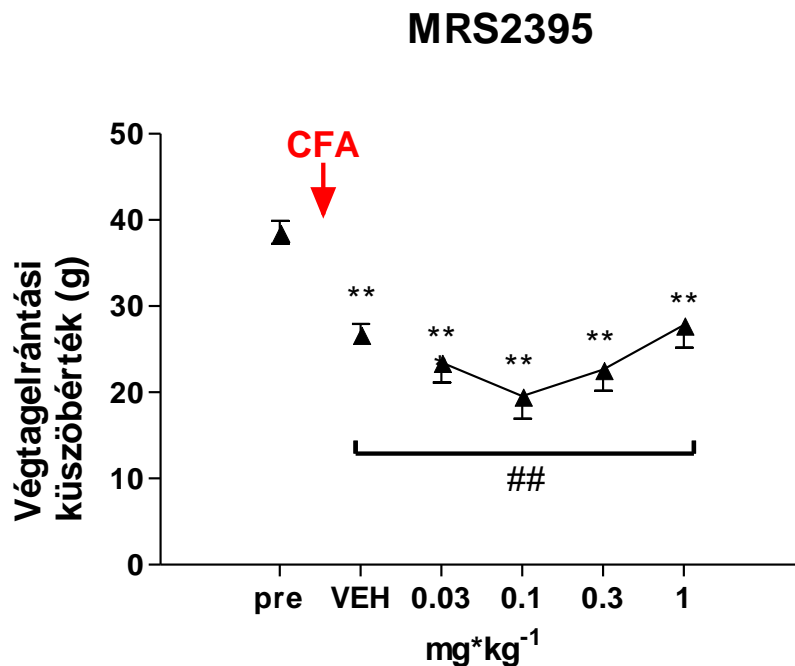
A végtagelrántási küszöbérték (PWT) alapértéke patkányok esetén 40.66 ± 0.38 g volt (n=185). A PWT 0.1 ml 50%-os intraplantáris CFA injekciót követően 20.12 ± 0.33 g-ra változott (48 órával a CFA kezelést követően), mely statisztikailag is jelentős 49%-os csökkenés ($p < 0.001$). A végtagelrántási küszöbértéket hasonlíthatjuk az ellenoldali, kezeletlen végtagon mért értékhez (38.80 ± 0.43 g), amely szintén szignifikánsan különbözött a CFA kezelt oldali végtagon mért értéktől. A CFA kezelésnek látható nyoma a kialakuló ödéma volt, amelynek mértéke az eredeti végtag 147%-a ($2.6 \pm$

0.01ml, n=185). Ez az érték is szignifikáns volt a pre értékhez (1.76 ± 0.01 ml, n=185) illetve az ellenoldali végtag térfogatához (1.77 ± 0.009 ml) viszonyítva egyaránt ($p < 0.001$ minden esetben).

Az MRS2395 dózisfüggő fájdalomcsillapító hatással bírt az általunk tesztelt 0.03 -1 mg/kg dózistartományban. Az Emax és MED értéket 1 mg/kg-nál mértük ki (**8. ábra**, 27.82 ± 2.63 g, n=6, $p < 0.05$). A clopidogrelt 1-30 mg/kg tartományban teszteltük (**9. ábra**). A 10 legkisebb hatékony dózis hatásának mértéke hasonló volt az MRS2395-hoz (PWT= 28.4 ± 1.4 g, n=6, $p < 0.01$). Ebben az esetben is dózisfüggő fájdalomcsillapító hatást detektáltunk, mely 30 mg/kg-nál érte el maximális hatását (PWT= 29.32 ± 1.53 g, n=6, $p < 0.01$). A ticlopidine-t a többi hatóanyaghoz képest ismét magasabb dózistartományban (3-100 mg/kg) vizsgáltuk meg. A ticlopidine 3 mg/kg-ban szignifikáns fájdalomcsillapító hatást fejtett ki a gyulladáshoz társuló fájdalomban és a hatás mértéke (PWT= 24.58 ± 2.19 g, n=6, $p < 0.01$) csaknem megegyezett a clopidogrel hatásával (**10. ábra**). 100 mg/kg-ban ennél is nagyobb mértékű hatást tapasztaltunk (32.33 ± 3.97 g, n=6, $p < 0.01$). A PSB-0739 hatását 0.01-3 mg/kg dózistartományban kétféle adagolási móddal, intraperitoneálisan és intrathecálisan vizsgáltuk meg. Intraperitoneális adagolásakor nem tapasztaltunk fájdalomcsillapító hatást (**11. ábra A**). Centrális adagolásakor azonban szignifikáns és dózisfüggő antiallodyniás hatást tapasztaltunk (mED: 0.1 mg/kg, PWT= 25.00 ± 1.10 g, n=6, $p < 0.01$, Emax:0.3 mg/kg, PWT= 29.25 ± 2.53 , n=6, $p < 0.001$) (**11. ábra B**). A cangrelor szignifikáns és dózisfüggő fájdalomcsillapító hatást mutatott. A cangrelor P2Y₁₂ receptorokon való potens gátló hatásával összhangban a legkisebb hatékony dózis 0.1 mg/kg volt (PWT= 29.25 ± 1.09 , n=6, $p < 0.001$) a legnagyobb hatást 1 mg/kg dózis esetén mértük (32.63 ± 2.19 , n=6, $p < 0.001$, **12. ábra**). A reactive blue 2 is szignifikáns fájdalomcsillapító hatást fejtett ki: a mED és a maximális hatás dózisa 0.6 mg/kg (26.68 ± 0.82 g, n=6, $p < 0.01$) volt, 1 mg/kg feletti dózisban (3 mg/kg) azonban eltűnt a szer hatása (**13. ábra**). A CFA által indukált gyulladáshoz társuló modell eredményeinek összefoglalásaként a minimális hatékony dózis alapján az általunk vizsgált antagonistákat az alábbi rangsorba állíthatjuk:

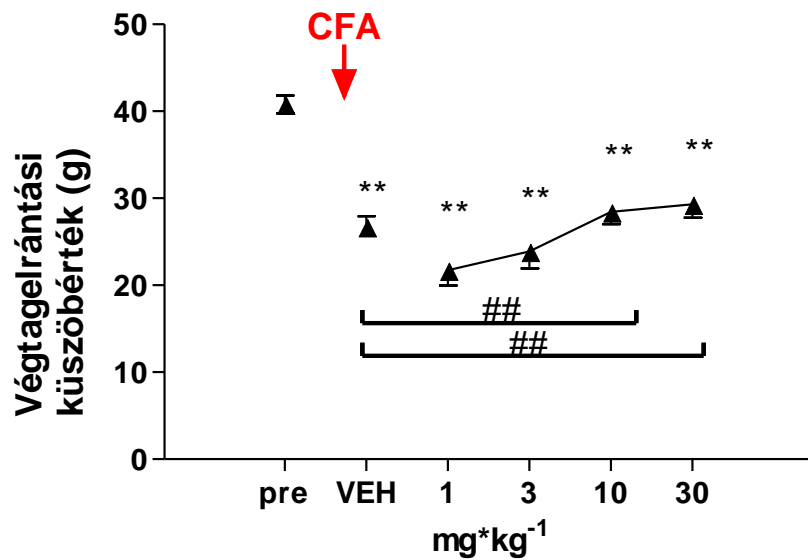
PSB-0739 it.= cangrelor > reactive blue 2 > MRS2395 > ticlopidine > clopidogrel

A szubakut mechanikus allodyniára mért hatás a fájdalomcsillapító hatás, míg a gyulladt végtag térfogatát befolyásoló hatás a gyulladáscsökkentő hatás egy lehetséges indikátora. Az általunk vizsgált antagonisták mindegyike szignifikáns fájdalomcsillapító hatással bírt, de gyulladáscsökkentő, tehát a gyulladt végtag térfogatát csökkentő hatása csak a ticlopidinnek volt (**15. B ábra**). Ez esetben dózisfüggő anti-inflammatorikus hatást tapasztaltunk. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a P2Y₁₂ receptor által közvetített fájdalomcsillapító hatás független a gyulladáscsökkentő hatástól.

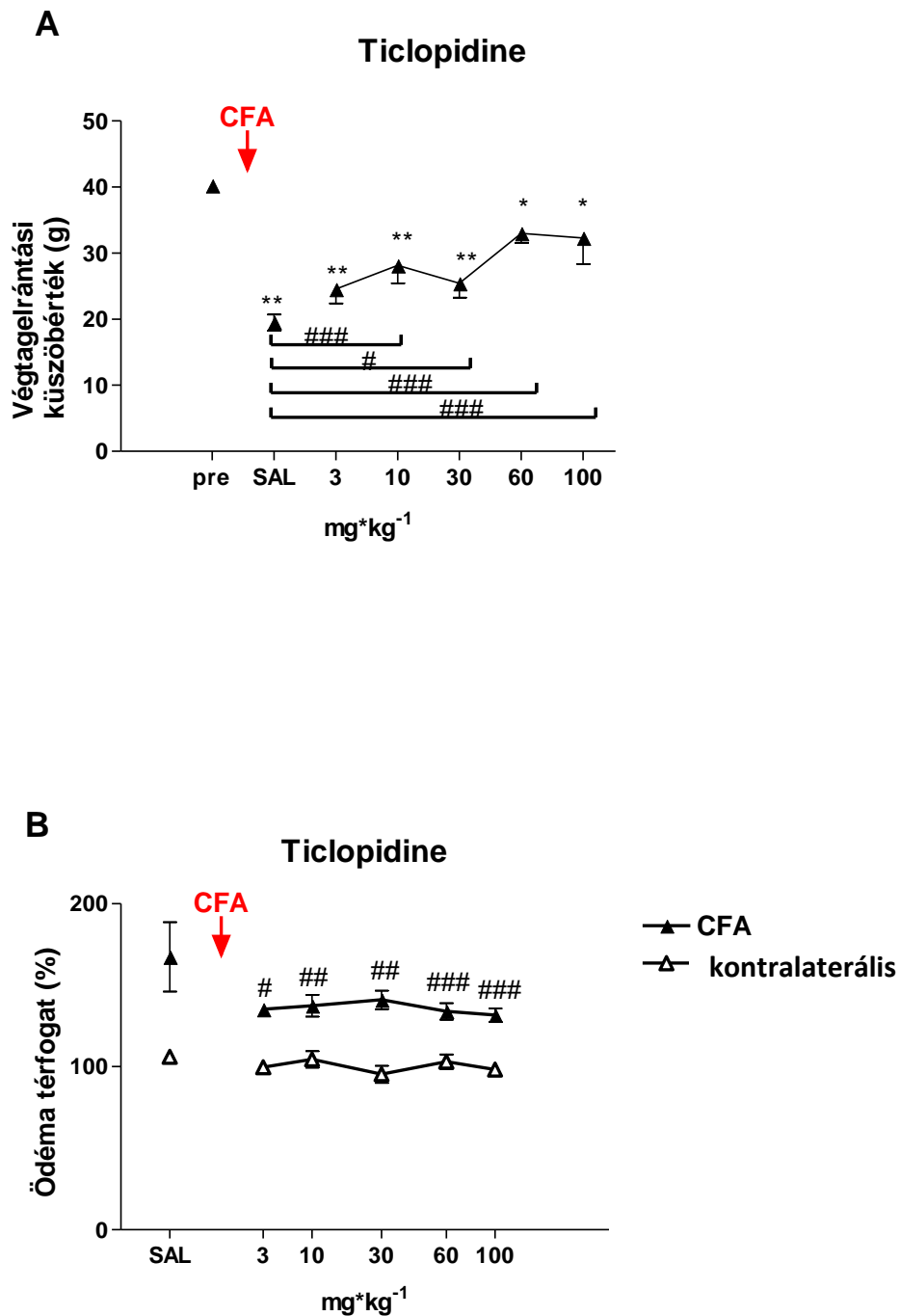


8. ábra Az MRS2395 dózisfüggő hatása a mechanikus allodyniára intraplantáris CFA kezelést követően. A méréseket a kezelés előtt (pre), illetve a kezelést követő 48. órában végeztük 30 perccel az abszcisszán jelölt MRS2395 dózis, illetve a vivőanyag (VEH) ip. injekcióját követően. **p <0.01, szignifikáns eltérés a CFA kezelés előtti értékhez viszonyítva. #p <0.05, szignifikáns eltérés a CFA kezelés utáni értékhez viszonyítva. N=6.

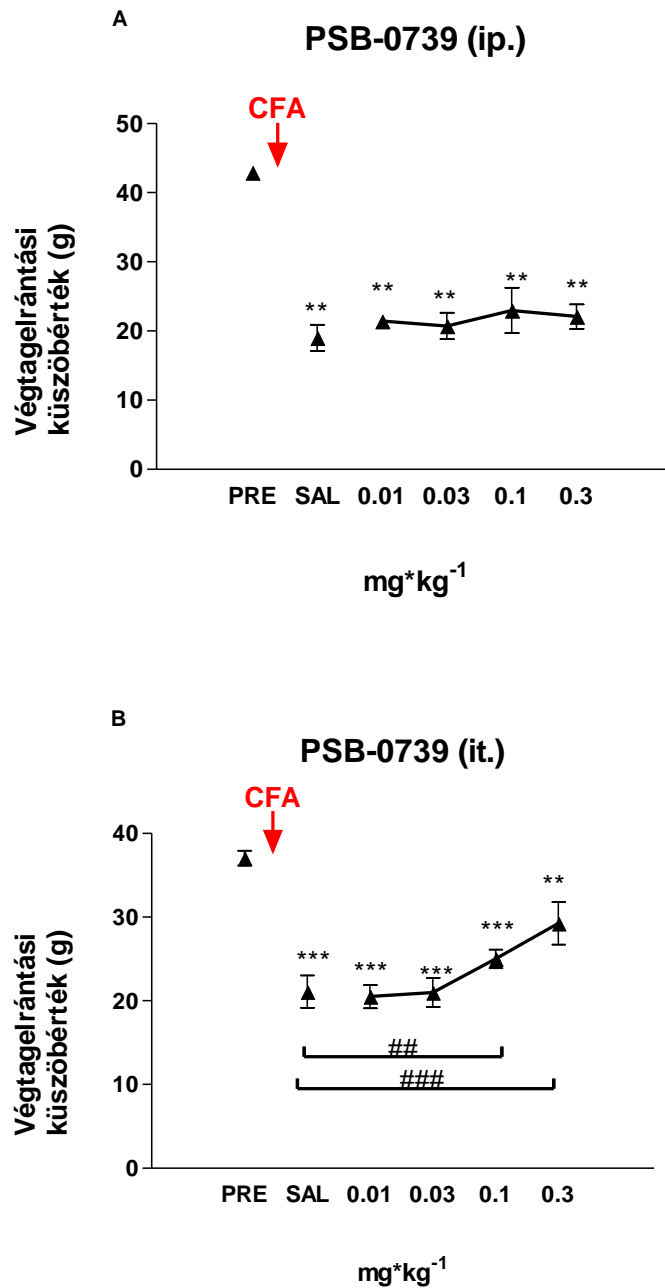
Clopidogrel



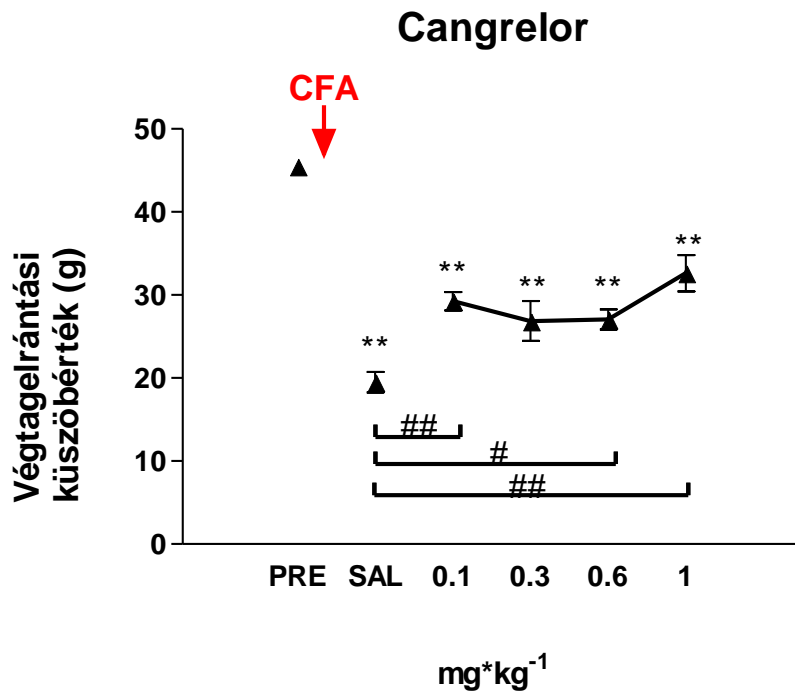
9. ábra A (\pm) clopidogrel dózisfüggő hatása a mechanikus allodyniára intraplantáris CFA kezelést követően. A méréseket a kezelés előtt (pre), illetve a kezelést követő 48. órában végeztük 30 perccel az abszcisszán jelölt (\pm) clopidogrel dózis, illetve a vivőanyag (VEH) ip. injekcióját követően. **p <0.01, szignifikáns eltérés a CFA kezelés előtti értékhez viszonyítva. ## p <0.01, szignifikáns eltérés a CFA kezelés utáni értékhez viszonyítva. N=6.



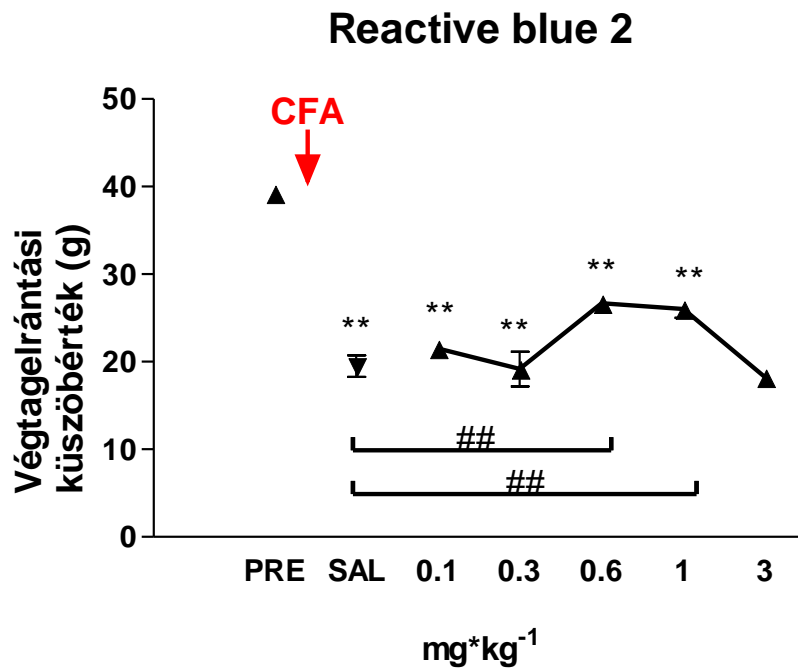
10. ábra A ticlopidine dóziszfüggő hatása a mechanikus allodyniára (A) és az ödémára (B), intraplantáris CFA kezelést követően. A méréseket a kezelés előtt (pre), illetve a CFA kezelést követő 48. órában végeztük 30 perccel az abszcisszán jelölt ticlopidine dózis, illetve a vivőanyag (fiziológiás sóoldat, SAL) ip. injekcióját követően.*p < 0.05, **p < 0.01, szignifikáns eltérés a CFA kezelés előtti értékhez viszonyítva. #p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001, szignifikáns eltérés a CFA kezelés utáni értékhez viszonyítva. N=6.



11. ábra A PSB-0739 intraperitoneális (A) és intrathecalis (B) adagolásának hatása a mechanikus allodyniára intraplantáris CFA kezelést követően. A méréseket a kezelés előtt (pre), illetve a CFA kezelést követő 48. órában végeztük 30 perccel az abszcisszán jelölt PSB-0739 dózis, illetve fiziológias sóoldat (SAL) ip. injekcióját követően. **p < 0.01, szignifikáns eltérés a CFA kezelés előtti értékhez viszonyítva. N=5-8/csoport



12. ábra A cangrelor dóziszfüggő hatása a mechanikus allodyniára intraplantáris CFA kezelést követően. A méréseket a kezelés előtt (pre), illetve a CFA kezelést követő 48. órában végeztük 30 perccel az abszcisszán jelölt cangrelor dózis, illetve fiziológias sóoldat (SAL) ip. injekcióját követően. **p < 0.01, szignifikáns eltérés a CFA kezelés előtti értékhez viszonyítva. #p < 0.05, ## p < 0.01, szignifikáns eltérés a CFA kezelés utáni értékhez viszonyítva. N=5-6/csoport.



13. ábra A reactive blue 2 hatása a mechanikus allodyniára intraplantáris CFA kezelést követően. A méréseket a kezelés előtt (pre), illetve a CFA kezelést követő 48. órában végeztük 30 perccel az abszcisszán jelölt reactive blue 2 dózis, illetve fiziológiás sóoldat (SAL) ip. injekcióját követően. **p <0.01, szignifikáns eltérés a CFA kezelés előtti értékhez viszonyítva. #p <0.05, ## p <0.01, szignifikáns eltérés a CFA kezelés utáni értékhez viszonyítva. N=6/csoport.

5.1.3. Neuropátiás fájdalommodell

A P2Y₁₂ receptor antagonisták neuropátiás fájdalomra gyakorolt hatását a Seltzer modellben vizsgáltuk, amelyben az ülőideg részleges lekötésével idézzük elő a szenzoros neuropátiát. A végtagelrántási küszöbérték 41.20 ± 0.37 g volt (n = 151) a

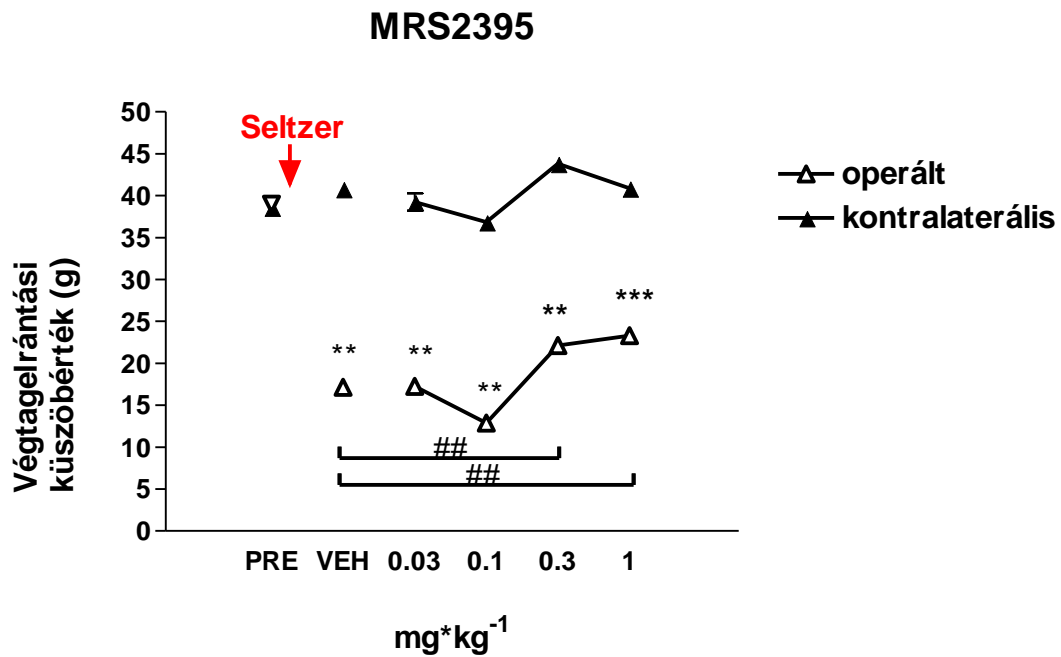
beavatkozást megelőzően. A küszöbérték egy héttel a műtét után, mintegy 55%-kal csökkent 18.48 ± 0.28 g értékre ($n=151$), mely statisztikailag szignifikáns volt ($p < 0.001$). Kontrollként megmértük az ellenoldali végtagon az elrántási küszöbértéket, mely a pre értékhez hasonlóan bizonyult (41.72 ± 0.34 g, $n = 151$). Az általunk vizsgált antagonisták hatásait a beavatkozást követő egy hét elteltével mértük meg, 30 illetve 15 perccel ip., illetve it. adagolást követően.

Neuropátiás fájdalomban az MRS2395-nek dóziszfüggő és szignifikáns fájdalomcsillapító hatása volt (**14. ábra**), mely csoportunk korábban közölt mérési eredményeivel, illetve a szakirodalomban fellelhető adatokkal is egybevágh (Ando és munkatársai, 2010; Kobayashi és munkatársai, 2006). A mED értékét 0.3 mg/kg dózis esetén (22.12 ± 0.76 g, $n=6$, $p < 0.01$) és a maximális hatást 1 mg/kg-nál mértük (23.3 ± 1.4 g, $n=6$, $p < 0.001$). A clopidogrel (1-60 mg/kg) ugyancsak szignifikáns antiallodyniás hatást idézett elő a Seltzer modellben (**15. ábra**). A mED érték ez esetben 3 mg/kg volt (24.01 ± 1.52 , $n=6$, $p < 0.01$), a maximális hatást 30 mg/kg-ban értük el (28.10 ± 1.33 g, $n=6$, $p < 0.001$). A maximális hatás a preoperatív érték kb. 70% -a volt. A ticlopidine szintén dóziszfüggő fájdalomcsillapító hatást eredményezett a 3-100 mg/kg dózistartományban (**16. ábra**). A mED ebben az esetben 30 mg/kg volt (28.17 ± 1.72 g, $n=6$, $p < 0.001$), a maximális hatást 100 mg/kg dózis esetén tapasztaltuk (37.02 ± 3.04 g, $n=6$, $p < 0.001$), mely jelentős volt, ekkor az allodynia csaknem teljesen megszűnt. A humán terápiában használt antiaggregáns vegyület ticlopidine dózishatásgörbéje ez esetben is meredekebb volt, mint a többi tesztelt antagonistáé. A PSB-0739-nek (0.003-0.1 mg/kg) intraperitoneális adagolással ebben az esetben is elhanyagolható hatása volt a vizsgált dózisokban (**17. ábra**), intrathecalis adagolásakor azonban dóziszfüggő, szignifikáns hatásúnak bizonyult. A legkisebb hatékony dózis 0.1 mg/kg volt (21.91 ± 1.80 g, $n=6$, $p < 0.001$), mely egyben a legerősebb hatás dózisa is volt. A cangrelor (0.1-3 mg/kg) esetében szignifikáns fájdalomcsillapító hatást már az általunk vizsgált legalacsonyabb dózisban (0.1 mg/kg) is tapasztaltunk (23.77 ± 1.38 g, $n=6$, $p < 0.01$), az ennél magasabb dózisokban azonban csupán tendenciózus, mérsékelt dóziszfüggő hatást tapasztaltunk (**18. ábra**). A legnagyobb hatást (E_{max}) a dózisok közül a 0.6 mg/kg-ban mértünk (25.72 ± 1.31 g, $n=6$, $p < 0.001$), ez volt az antiallodyniás hatás platója. A reactive blue 2 nem volt hatással a végtagelrántási küszöbértékekre ebben a fájdalommodellben (**19. ábra**).

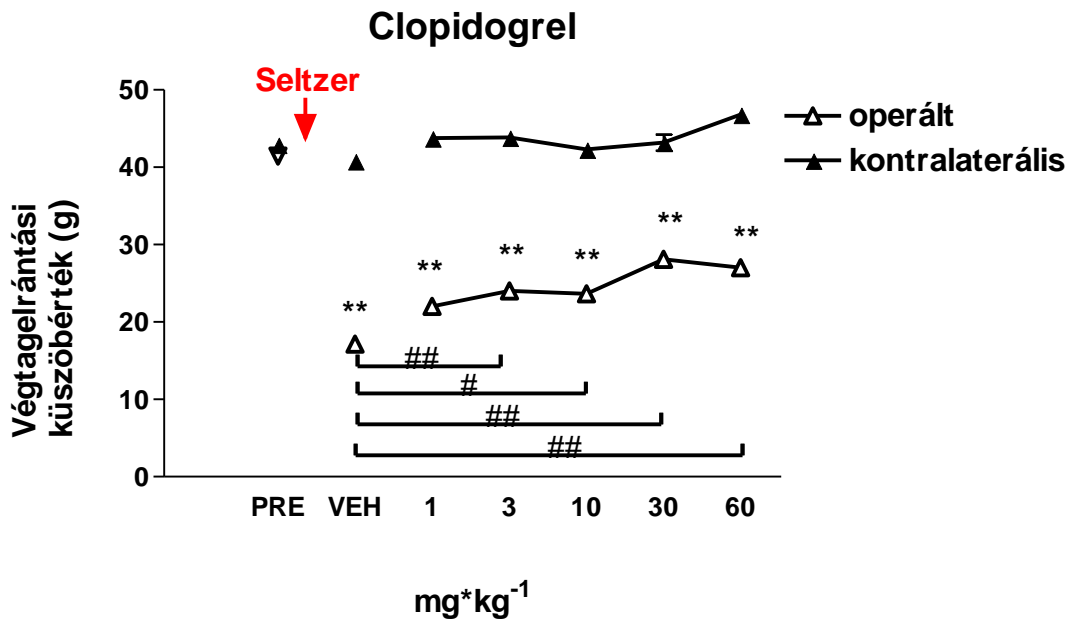
Összességében a neuropátiás fájdalom esetében vizsgált vegyületek közül ötnek volt szignifikáns antiallodyniás hatása. Ebben a modellben a dózishatásgörbék viszonylag laposak voltak és a preoperatívhoz viszonyított (100%-os) antiallodyniás hatás nem volt teljes. Ez alól kivételnek számít a ticlopidine, mely 100 mg/kg dózisban igen hatékonyan bizonyult. A legkisebb hatékony dózis által felállított sorrend a neuropátiás fájdalommodellben az alábbiak szerint alakult:

PSB-0739 (it.)= cangrelor> MRS2395> clopidogrel> ticlopidine.

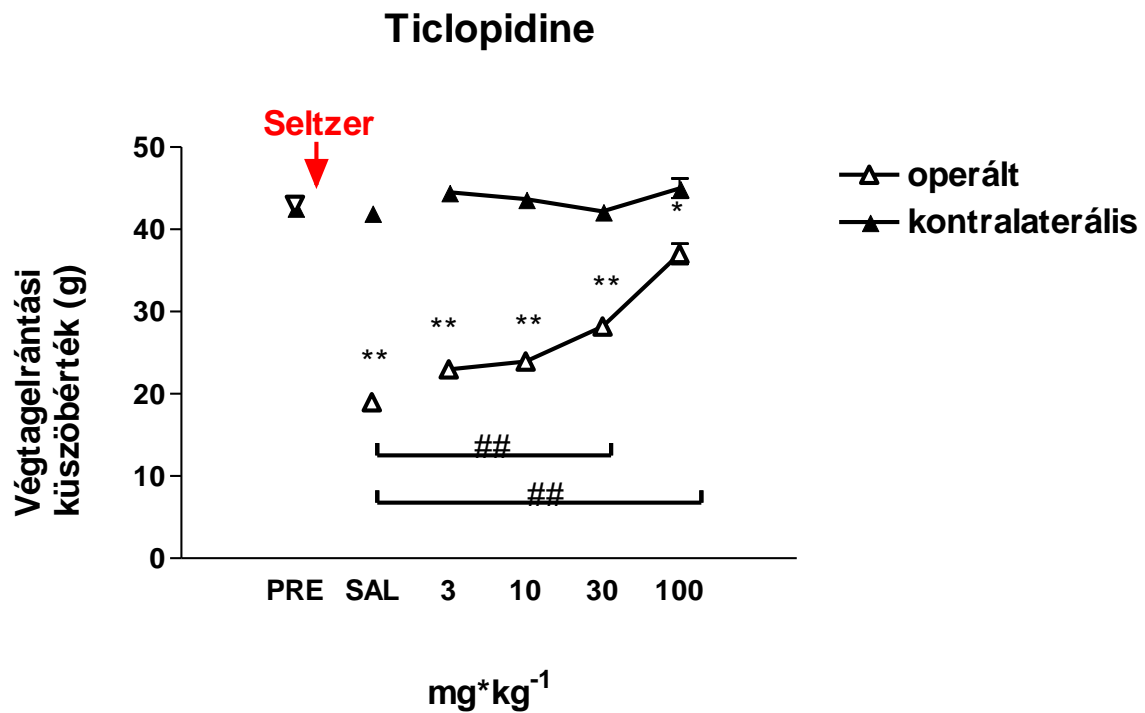
A három különböző fájdalommodell eredményeit egybevetve a vizsgálatok igazolták a P2Y₁₂ receptorgátlás fájdalomcsillapító hatását mind akut termális nocifenzív reakció, mind a gyulladáshoz társított fájdalom, valamint neuropátiás fájdalom esetében is. Eltérő kémiai szerkezetű antagonistáknál is megfigyelhető volt fájdalomcsillapító hatás. Az általunk használt potens és szelektív antagonisták PSB-0739, illetve a potens P2Y_{12/13} receptorantagonista cangrelor bizonyultak a leghatékonyabbnak mindhárom fájdalom típusban. A PSB-0739 csak centrálisan adagolva volt hatékony, ezért arra következtetünk, hogy a fájdalomcsillapító hatásának kiindulópontja feltehetően centrális (**1. és 2. táblázat**, 87. oldal).



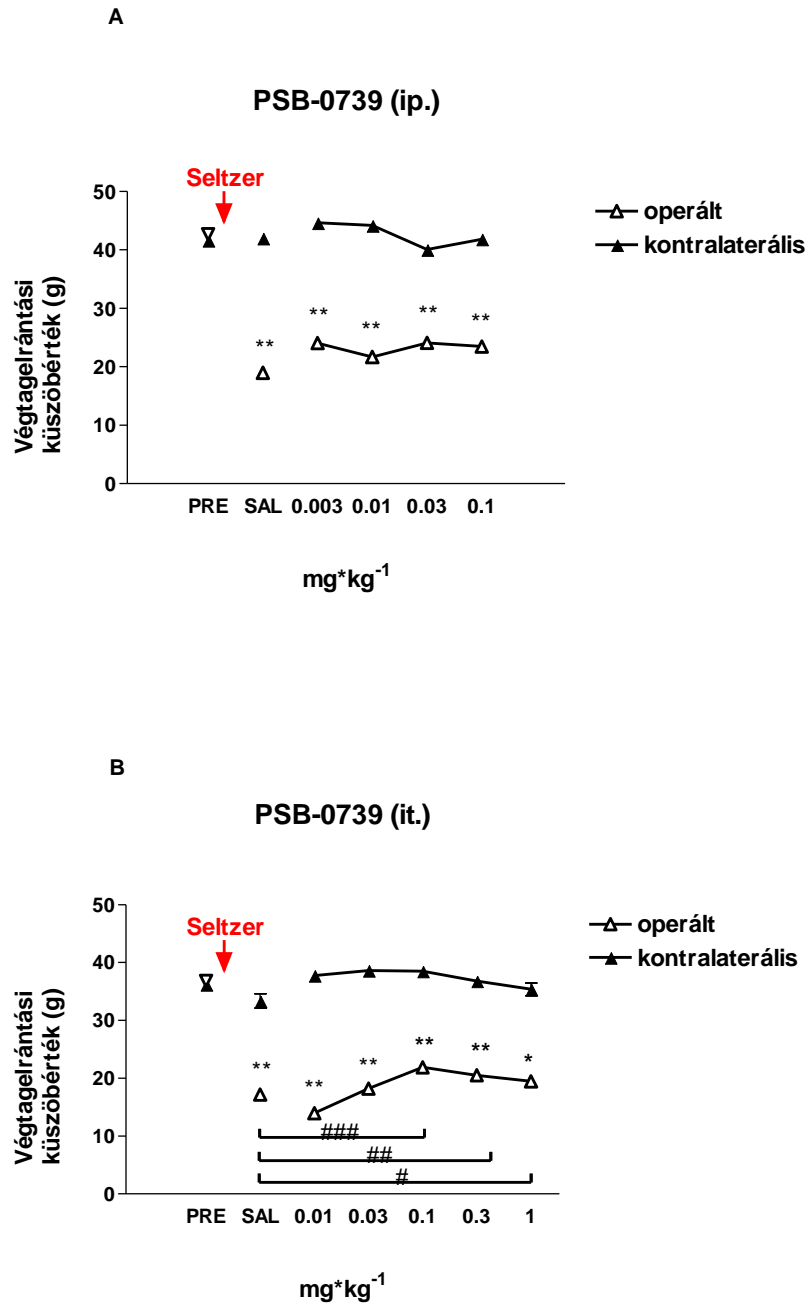
14. ábra Az MRS2395 hatása a mechanikus allodyniára a Seltzer modellben. A méréseket a műtét előtt (pre), illetve műtétet követő 7. napon végeztük az operált (üres háromszögek), illetve az ellenoldali lábón (kitöltött háromszögek), 30 perccel az abszcisszán jelölt MRS2395 dózis ip. injekcióját követően. **p < 0.01, szignifikáns eltérés a műtét előtti értékhez viszonyítva. ## p < 0.01, szignifikáns eltérés a műtét utáni értékhez viszonyítva.



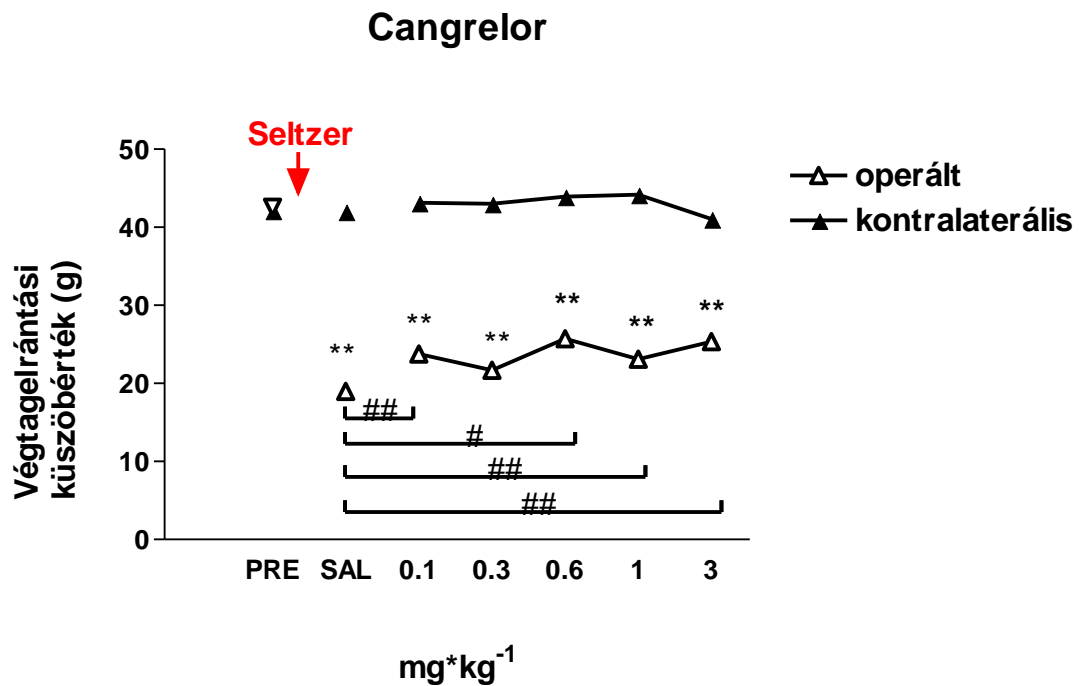
15. ábra A clopidogrel dózisfüggő hatása a mechanikus allodyniára a Seltzer modellben. A méréseket a műtét előtt (pre), illetve műtétet követő 7. napon végeztük az operált (üres háromszögek), illetve az ellenoldali lábon (kitöltött háromszögek), 30 perccel az abszcisszán jelölt clopidogrel ip. injekcióját követően. ** $p < 0.01$, szignifikáns eltérés a műtét előtti értékhez viszonyítva. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, szignifikáns eltérés a műtét utáni értékhez viszonyítva



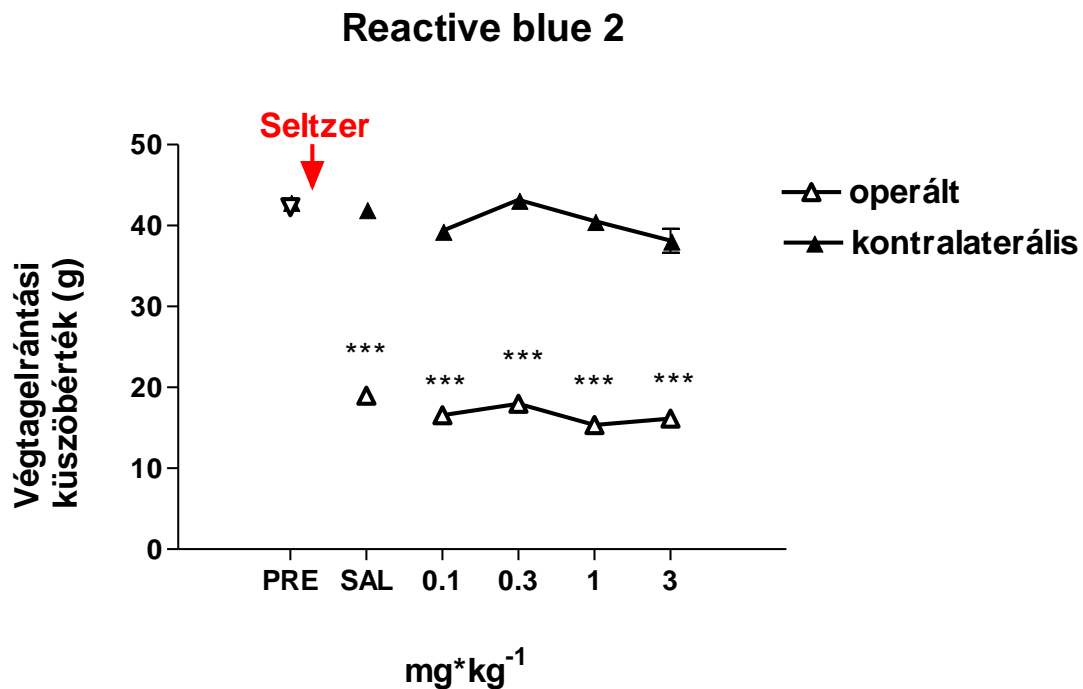
16. ábra A ticlopidine dóziszfüggő hatása a mechanikus allodyniára a Seltzer modellben. A méréseket a műtét előtt (pre), illetve műtétet követő 7. napon végeztük az operált (üres háromszögek), illetve az ellenoldali lábon (kitöltött háromszögek), 30 perccel az abszcisszán jelölt ticlopidine ip. injekcióját követően. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, szignifikáns eltérés a műtét előtti értékhez viszonyítva. ## $p < 0.01$, szignifikáns eltérés a műtét utáni értékhez viszonyítva.



17. ábra Az intraperitoneális (A), illetve az intrathecalis (B) PSB-0739 adagolás hatása a mechanikus allodyniára a Seltzer modellben. A méréseket a műtét előtt (pre), illetve műtétet követő 7. napon végeztük az operált (üres háromszögek), illetve az ellenoldali lábon (kitöltött háromszögek), 30, illetve 15 perccel az abszcisszán jelölt PSB-0739 ip., illetve it. injekcióját követően. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, szignifikáns eltérés a műtét előtti értékhez viszonyítva. ### $p < 0.001$, ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$ szignifikáns eltérés a műtét utáni értékhez viszonyítva.



18. ábra A cangrelor dózisfüggő hatása a mechanikus allodyniára a Seltzer modellben. A méréseket a műtét előtt (pre), illetve műtétet követő 7. napon végeztük az operált (üres háromszögek), illetve az ellenoldali lábon (kitöltött háromszögek), 30 perccel az abszcisszán jelölt cangrelor ip. injekcióját követően. **p < 0.01, szignifikáns eltérés a műtét előtti értékhez viszonyítva. # p < 0.05, ## p < 0.01, szignifikáns eltérés a műtét utáni értékhez viszonyítva.



19. ábra A reactive blue 2 hatása a mechanikus allodyniára a Seltzer modellben. A méréseket a műtét előtt (pre), illetve műtétet követő 7. napon végeztük az operált (üres háromszögek), illetve az ellenoldali lábon (kitöltött háromszögek), 30 perccel az abszcisszán jelölt cangrelor ip. injekcióját követően. *** $p < 0.001$, szignifikáns eltérés a műtét előtti értékhez viszonyítva.

5.1.4. P2Y₁₂ receptor génkiütés nocifenzív reakciót befolyásoló hatása

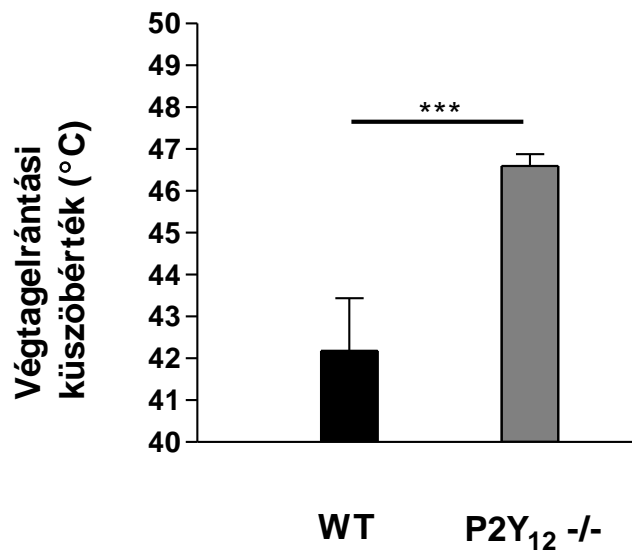
A farmakológia vizsgálatokon túlmenően *in vivo* tesztek segítségével egy másik megközelítéssel, génkiütéssel is megvizsgáltuk a P2Y₁₂ receptor fájdalom transzmisszióban betöltött szerepét. A Deltagentől beszerzett KO egerek a kísérletek kezdetén 60 napos korúak voltak, kontrollként C57 Bl/6 állatokat vizsgáltunk.

Akut termális fájdalom esetén a vad típusú egereknél mért nocifenzív küszöbértékek hasonlóak voltak a patkányokon mért értékekhez (42.2 ± 1.3 °C). Ez az érték azonban számottevően magasabb volt génkiütött egerek esetén (46.6 ± 0.3 °C, $n=8$, $P=0.002$, 20. ábra).

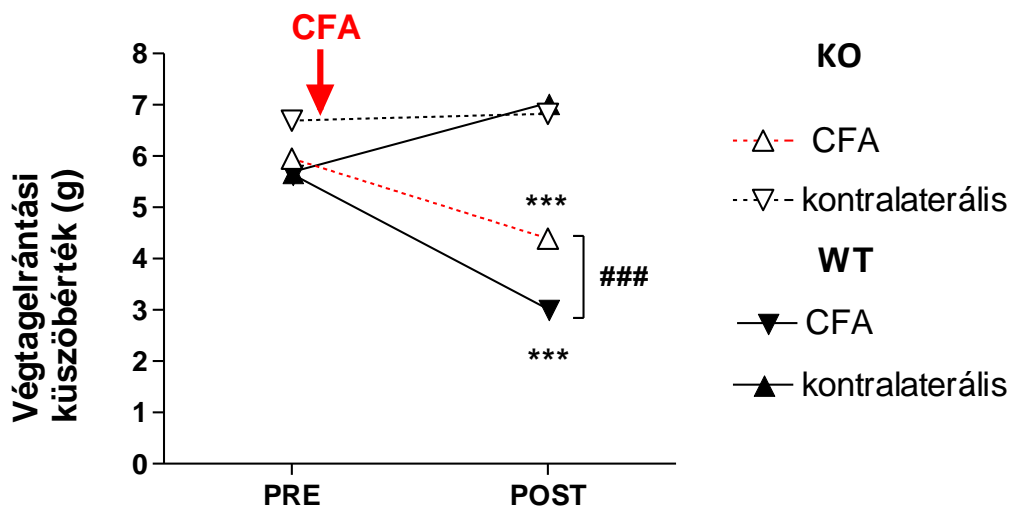
A Von Frey tesztben mért végtagelrántási küszöbértékek 5.65 ± 0.27 g és 5.95 ± 0.17 voltak vad típusú, illetve P2Y₁₂ -/- állatokon, mely értékek egymástól nem különböztek szignifikánsan ($n=10$, $p > 0.05$). 30 μ L, 50%-os intraplantáris CFA injekciót követően a kezelt oldali végtagelrántási küszöbérték jelentős mértékben csökkent vad típusú (WT) állatok esetében. Hasonló jelenséget észleltünk génkiütött egerek (KO) esetében is, tehát a post CFA érték csökkenését tapasztaltuk, ám a fájdalmi reakció enyhébbnek bizonyult, tehát a kezelt oldali végtagelrántási küszöbérték tekintetében szignifikáns eltérést tapasztaltunk vad típusú és génkiütött egerek között (**21. ábra**, ANOVA genotípus \times pre–post \times azonos oldal-ellenoldal $F_{1,18} = 9.16$, $p < 0.01$).

A neuropátiás fájdalommodellben a preoperatív PWT értékek hasonlóak voltak a gyulladásos modell pre értékeihez, vad típusú és KO állatokban egyaránt. Az ülőideg részleges lekötését követő egy héttel szignifikáns fájdalmi küszöbérték csökkenést tapasztaltunk mindkét vizsgált csoport esetében. Az előző kísérlethez hasonlóan itt is enyhébb fokú fájdalmi reakciót tapasztaltunk a csoportok között, a KO állatok posztoperatív értékei magasabbak voltak a vad típusú állatok értékeihez viszonyítva (**22. ábra**, ANOVA, genotípus \times pre-post \times azonos oldal-ellenoldal $F_{1,12} = 19.81$, $p < 0.001$).

Az eredményeket összegezve elmondható, hogy génkiütött egereken végzett kísérletsorozat eredményei egybevágóak a farmakológiai vizsgálataink eredményeivel, a P2Y₁₂ fájdalomban betöltött szerepét megerősítik a kapott adatok.

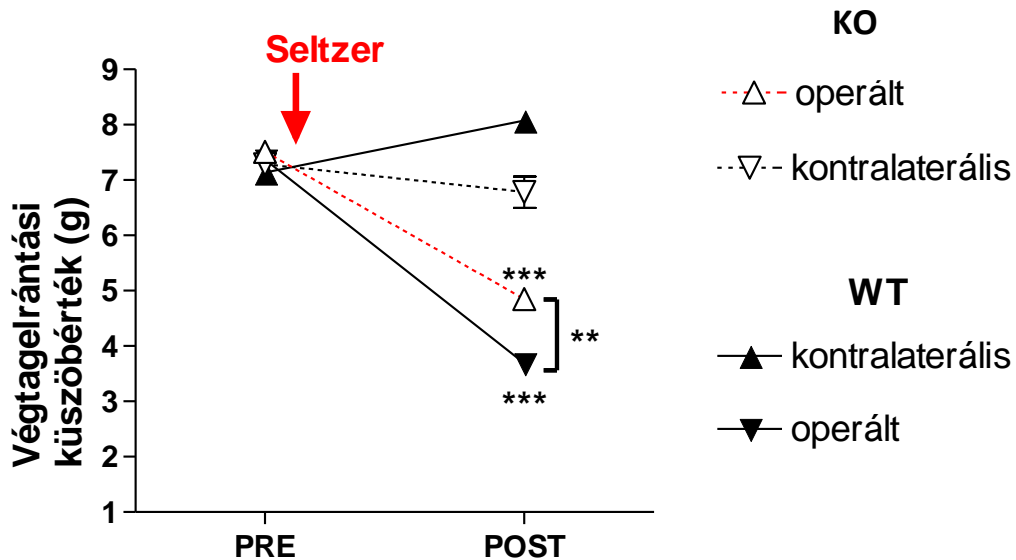


20. ábra Nocifenzív küszöbhőmérséklet (PWT) értékek a hot plate tesztben vad típusú (WT), illetve génkiütött (KO) állatok esetében. A kísérleti állatokon 2 kontroll mérést végeztünk, melyeket átlagoltunk. A PWT értékeket °C-ban fejeztük ki. A P2Y₁₂ receptor génkiütött egerek magasabb hőmérséklet toleráltak. (n=10, ***p < 0.001).



21. ábra Mechanikus allodynia értékek intraplantáris CFA (Complete Freund's adjuvant, Komplet Freund Adjuváns) indukált gyulladásos fájdalommodellben P2Y₁₂ receptor génkiütött (KO) és vad típusú (WT) egerekben. A méréseket a kezelés előtt (pre), illetve a CFA kezelést követő 48. órában végeztük el a kezelt oldali és az ellenoldali végtagon. ***p < 0.001, szignifikáns eltérés a CFA kezelés

előtti értékhez viszonyítva. ### $p < 0.001$, szignifikáns eltérés a különböző genotípusú egerek végtagelrántási küszöbértékei között 48 órával a CFA kezelést követően. $n=10$ /csoport



22. ábra Mechanikus allodynia értékek a neuropátiás fájdalommodellben $P2Y_{12}$ receptor génkiütött és vad típusú egerekben. A méréseket, a beavatkozás előtt (pre), illetve a műtétet követő hetedik napon végeztük a műtött és az ellenoldali végtagon egyaránt. *** $p < 0.001$, szignifikáns eltérés a műtét előtti értékhez viszonyítva. ### $p < 0.001$, szignifikáns eltérés a különböző genotípusú egerek végtagelrántási küszöbértékei között egy héttel a műtétet követően. $n=10$ /csoport

5.2. $P2Y_{12}$ antagonisták aktivitása rekombináns $P2Y_{12}$ receptoron

Az általunk használt $P2Y_{12}$ receptor antagonisták hatását megvizsgáltuk humán $P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$, $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$, $P2Y_{14}$ receptor mediált sejtválaszokra astrocytoma sejtvonalakon.

A kísérletekben suramin, reactive blue 2, PSB-0739, MRS2395 és cangrelor farmakológiai aktivitását vizsgáltuk, az isoproterenol (10 nM), illetve forskolin (10 μ M) által kiváltott cAMP szint emelkedésre, a P2Y₁₂ receptor agonista 2-MeSADP gátló hatásával szemben. Isoproterenol esetén 1321N1 sejteket, forskolinnal történő indukció esetében pedig CHO sejtvonalat használtunk. A 1321N1 sejteken isoproterenol (10 nM) hatására bekövetkező cAMP szint emelkedést a P2Y₁₂ receptor agonista 2-MeSADP (0.01-100 nM) együttadása koncentrációfüggően, kb. 0.3 nM IC₅₀ értékkel és kb. 60%-os maximális hatással gátolta.

A PSB-0739 hatékonyan antagonizálta a 2-MeSADP cAMP szintre gyakorolt hatását (pA₂=9.8) és a P2Y₁₂ receptoron jelentősen potensebb volt, mint a P2Y₁, P2Y₂, P2Y₁₁ és P2Y₁₃ receptorokon tapasztalt affinitása. Hatását megvizsgáltuk a kínai hörcsög ovárium sejtes modellben is. A kezdeti cAMP szintet (0.658±0.22 pmol) a forskolin 9.972±0.75 pmol-ra emelte. A P2Y₁₂ receptor agonista 2-MeSADP ezt a hatást is koncentrációfüggően gátolta, az EC₅₀ érték 0.49 nM volt, 1 μ M koncentrációnál volt elérhető a maximális hatás, amely 90 % fölötti volt (a kontroll 9.44 ± 0.99 %-a) (**23. ábra A**). A PSB-0739-nek (30 nM) nem volt jelentős hatása a bazális cAMP szintre (0.529±0.23; n=6, p> 0.05). A 2-MeSADP koncentráció-hatás görbéje a PSB-0739 (30 nM) jelenlétében párhuzamosan jobbra tolódott. Az EC₅₀ érték 119.6 nM volt. A PSB-0739 pK_b értéke ebben a vizsgálatban tehát még magasabb, 9.9 volt (**23. ábra, 3. táblázat**- 91. oldal). A PSB-0739 (30 nM) önmagában nem hatott a forskolin (10 μ M) által kiváltott sejtes cAMP szint emelkedésre (**23. ábra B**). A PSB-0739 tehát potens és szelektív P2Y₁₂ receptorantagonista.

Suramin (3, 10, 30 μ M) jelenlétében a 2-MeSADP koncentráció hatás görbéje párhuzamosan jobbra tolódott, a maximális hatás szignifikáns befolyásolása nélkül (**24. ábra A**). Ezt követően Schild-plot alapján felvettük a pA₂ értéket, mely 5.7-nek adódott (**24. ábra B, 3. táblázat**- 91. oldal). A suramin a P2Y₁₂ receptor mellett más purinerg receptorokat is gátolt, az affinitása a P2Y₁ receptor és a P2Y₁₃ receptor esetében hasonló a P2Y₁₂ receptoréhoz, míg az UDP-t preferáló P2Y₂, P2Y₄ és P2Y₆ receptorok esetében lényegesen alacsonyabbnak bizonyult (**3. táblázat**, 91. oldal). Ez utóbbi adatokat irodalmi adatok is alátámasztják (Charlton és munkatársai, 1996; Marteau és munkatársai, 2003; Robaye és munkatársai, 1997). A suraminról elmondható, hogy nem-szelektív vegyület és affinitása alacsony a P2Y₁₂ receptorhoz.

A reactive blue 2 is kompetitív antagonistaként viselkedett a vizsgálatok során, de a suraminnál hatékonyabbnak bizonyult, pA₂ értéke 7.4 (**25. ábra**), az általunk vizsgált többi P₂Y receptoron is hatott. A P₂Y₆-on pA₂=6 értéket mértünk, a P₂Y₁, P₂Y₂ és P₂Y₁₃ receptorokon pA₂ érték 5 körüli volt, a P₂Y₄ és P₂Y₁₁ esetében pedig még ennél is alacsonyabb. A reactive blue 2 viszonylag potens, de kevésbé szelektív antagonistája a P₂Y₁₂ receptornak. Az általunk tapasztalt eredmények az irodalmi adatokkal egyezők (Communi és munkatársai, 1996; Communi és munkatársai, 1999; Marteau és munkatársai, 2003; Robaye és munkatársai, 1997).

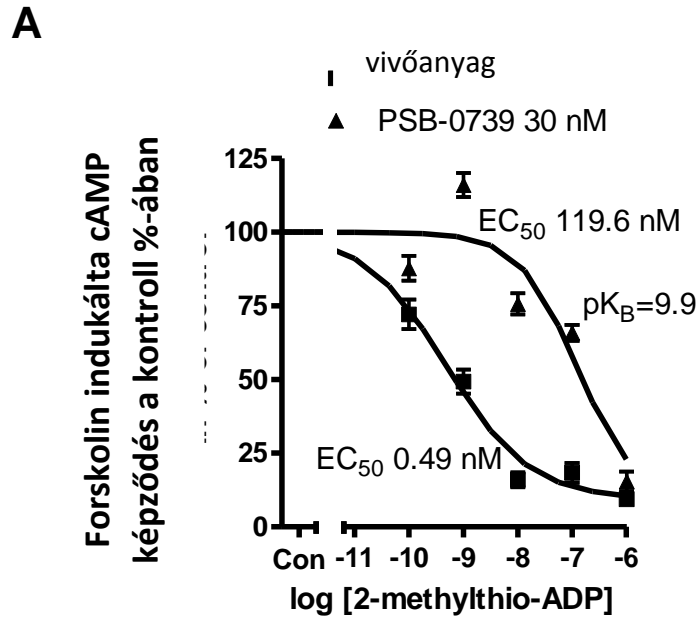
A cangrelor az első kísérleti modellben a PSB-0739-hez hasonló hatásereosséget mutatott. A 2-MeSADP hatását gátolta pK_b= 9.2 volt, ez irodalmi adatokkal is egyezik (Marteau és munkatársai, 2003; Takasaki és munkatársai, 2001; Vasiljev és munkatársai, 2003). Szelektivitását tekintve azonban a PSB-0739-től eltérően potensen gátolja a humán P₂Y₁₃ receptorokat is (**3. táblázat**, 91. oldal). A cangrelornak önmagában (100 nM) a CHO sejtes modellben nem volt hatása a bazális cAMP produkcióra (1.041±0.2 pmol, 1.58±0.33 pmol, a cangrelor hiányában és jelenlétében, p> 0.05). A cangrelor (100 nM) jelenlétében a 2-MeSADP gátló koncentráció-hatás görbéjének párhuzamos jobbrtolódását tapasztaltuk, a pK_b érték 8.7 volt (**26. ábra**, **3. táblázat**- 91. oldal). A PSB-0739-hez hasonlóan a cangrelor sem befolyásolta számottevően a forskolin (10 µM) által kiváltott sejtes cAMP szint emelkedést (**26. ábra B**). A cangrelor tehát potens P₂Y₁₂ és P₂Y₁₃ receptorokon ható antagonista.

Az MRS2395 hatását humán P₂Y₁₂ receptorral transzfektált CHO sejteken vizsgáltuk meg. Az MRS2395 (20 µM) nem befolyásolta a bazális cAMP termelést (2.306±0.73 pmol, és 1.77±1.05 pmol, az MRS2395 hiányában illetve jelenlétében, p> 0.05). A 2-MeSADP EC₅₀ értéke 0.26 nM volt az MRS2395 jelenlétében és hiányában egyaránt, nem tapasztaltunk párhuzamos jobbrtolódást a 2-MeSADP gátló koncentráció-hatás görbéjében (**27. ábra A**). A 2-MeSADP gátló koncentráció-hatásgörbén látható, hogy az MRS2395 jelenlétében mért cAMP szintek jóval magasabbak voltak, mint az oldószeres kontroll esetében, ami arra utal, hogy az MRS2395 önmagában is képes fokozni a cAMP szintet. Amikor az MRS2395 (20 µM) hatását teszteltük P₂Y₁₂ agonista hiányában, szignifikáns - forskolin által kiváltott - cAMP szint emelkedést tapasztaltunk, és ugyanilyen eredményt kaptunk az ál- transzfektált sejteken is (**27. ábra B, C**). Az MRS2395 tehát a vizsgált koncentrációban nem gátolja a humán P₂Y₁₂

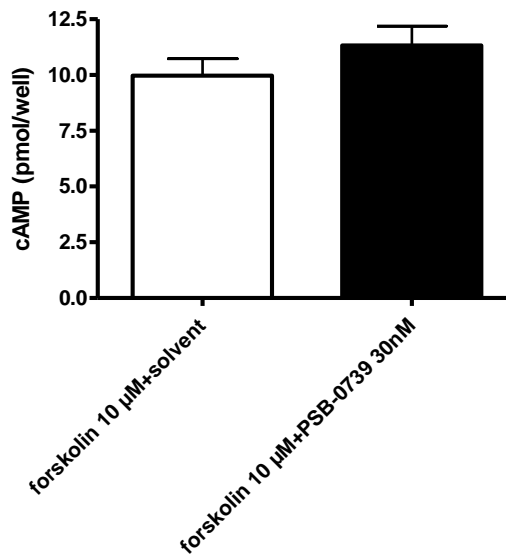
receptort. Ez az eredmény azért jelentős, mert az MRS2395-t rekombináns humán P2Y₁₂ receptoron eddig még nem vizsgálták. Az MRS2395 eddig vélt P2Y₁₂ receptor antagonistikus tulajdonsága natív patkány trombocitákon kapott közvetett adatokon alapult, mely szerint a P2Y₁ receptor által mediált trombocita aggregációt nem befolyásolja, így kizárásos alapon azt feltételezték, hogy a P2Y₁₂ receptoron hathat (Xu és munkatársai, 2002). Eredményeink azt mutatják, hogy az itt tapasztalt cAMP szintet fokozó hatása feltehetően P2Y₁₂ receptortól függetlenül, foszfodiészteráz gátlással függhet össze. Általunk már korábban (Ando és munkatársai, 2010), illetve jelen dolgozatban vizsgált és mások által tapasztalt (Kobayashi és munkatársai, 2008) *in vivo* fájdalomcsillapító hatásáról tehát elképzelhető, hogy nem feltétlenül P2Y₁₂ receptor mediált.

A pro-drog clopidogrel és ticlopidine ebben a rendszerben nem vizsgálható, ezért ennek a két antagonistának hatásait csak *in vivo* kísérletekben néztük meg.

Az *in vivo* kísérletek eredményeivel a vegyületek eltérő farmakokinetikai tulajdonságai miatt ugyan közvetlen korreláció nem állítható fel, megállapítható, hogy az *in vitro* potens P2Y₁₂ receptor antagonisták (PSB0739, cangrelor, reactive blue 2) *in vivo* is hatékonyak voltak, legalábbis a gyulladáscsökkentő fájdalomban. Az analgetikus hatások reprodukálhatóak voltak a humán terápiában használt P2Y₁₂ receptor antagonistákkal is (ticlopidine, clopidogrel) a klinikai gyakorlatban használt hatékony dózistartományban. Az MRS2395-ről kiderült, hogy nem valódi humán P2Y₁₂ receptorantagonista, *in vivo* hatékonysága valószínűleg más, eddig nem ismert hatásmechanizmussal magyarázható.

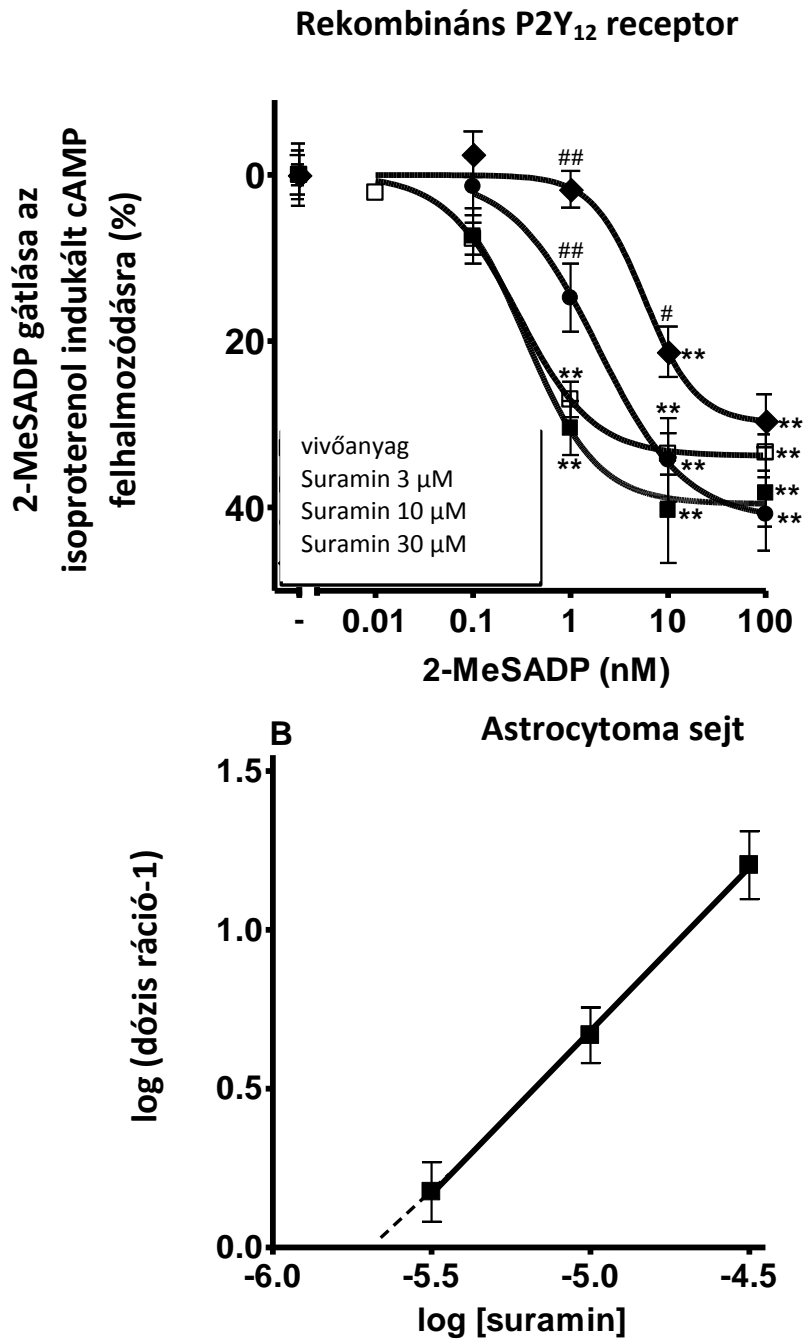


B Forskolin indukálta cAMP képződés

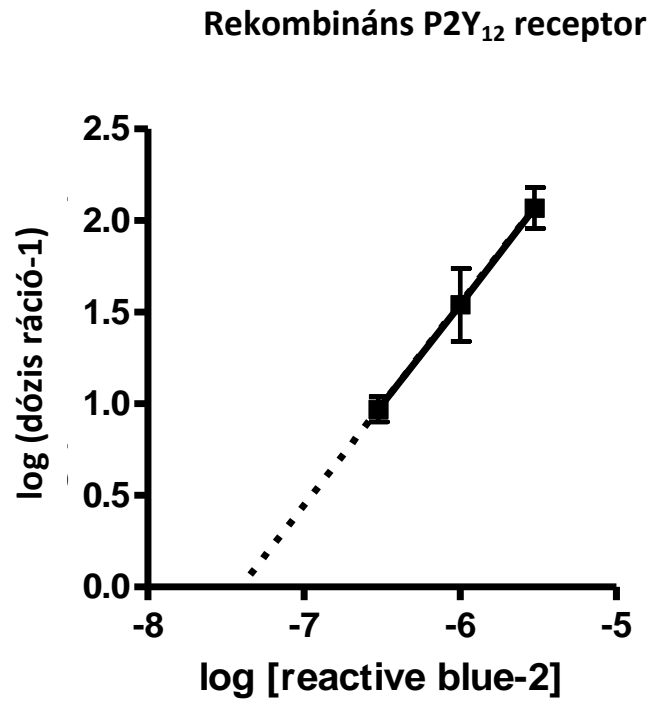


23. ábra A, A forskolin által kiváltott cAMP szint emelkedés gátlása a P2Y₁₂ receptor agonista 2-methylthio-ADP által a P2Y₁₂ receptorantagonista PSB-0739

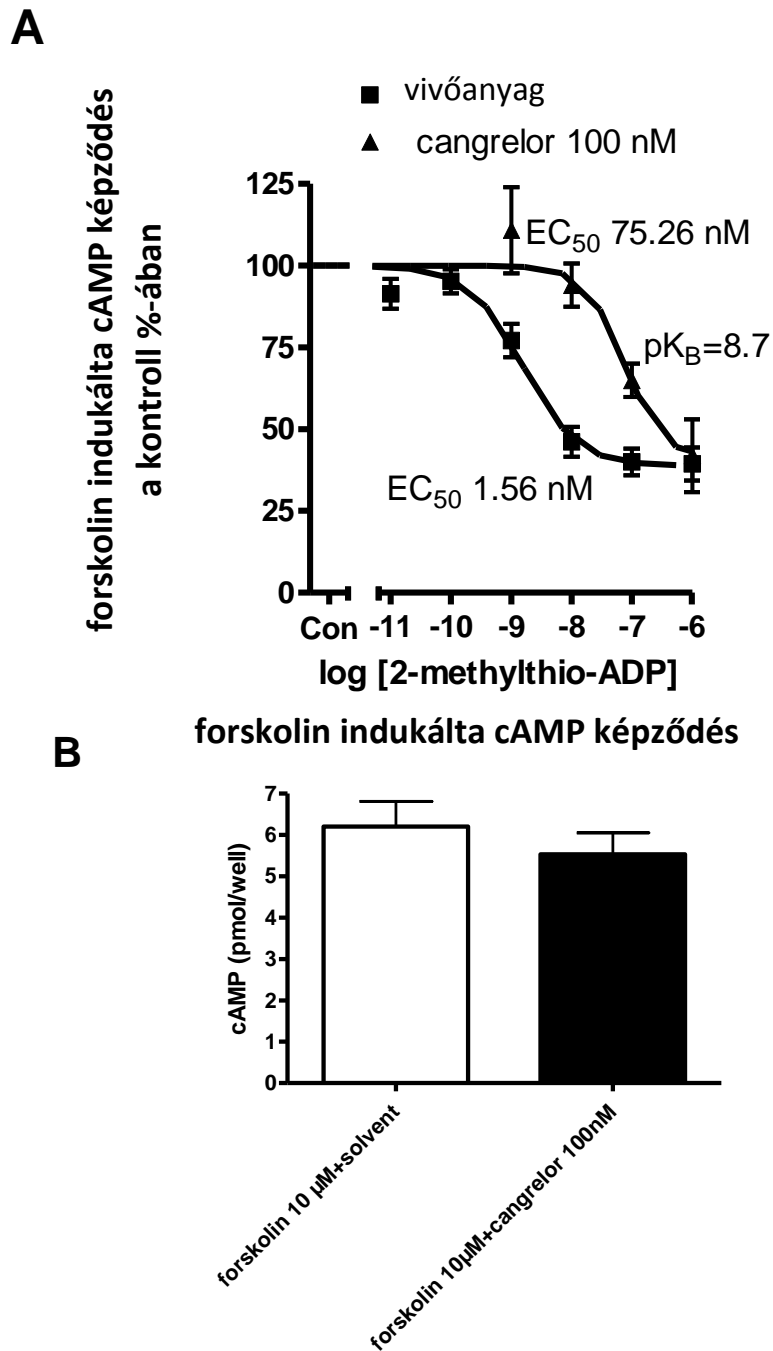
(30 nM) jelenlétében és hiányában P2Y₁₂ receptorral transzfektált CHO sejteken.
B, A PSB-0739 (30 nM) hatása a forskolin által kiváltott cAMP szint emelkedésre.



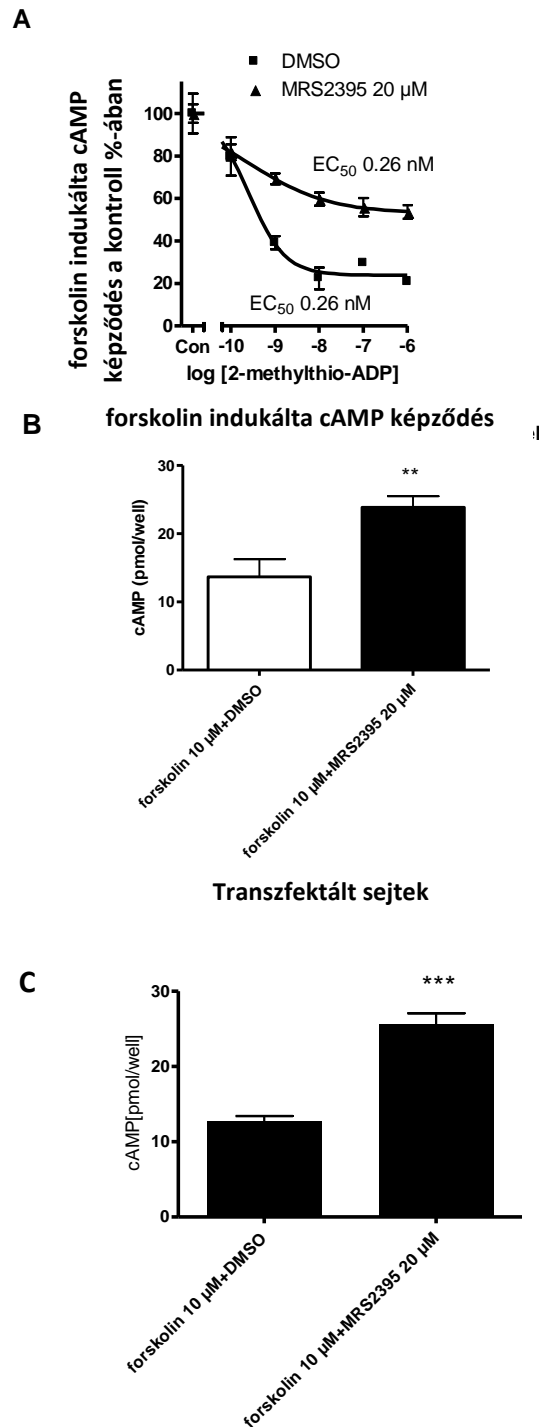
24. ábra A suramin hatása az isoproterenol által kiváltott cAMP szint emelkedés 2-MeSADP általi gátlására rekombináns P2Y₁₂ receptort kifejező 1321N1 astrocytoma sejtvonalon. A, koncentráció-hatás görbék az oldószer (solvent) és suramin jelenlétében. B, Schild-plot.



25. ábra A reactive blue 2 hatása az isoproterenol által kiváltott cAMP szint emelkedés 2-MeSADP általi gátlására rekombináns P2Y₁₂ receptort kifejező astrocytoma sejtvonalon. Schild-plot.



26. ábra A, A forskolin által kiváltott cAMP szint emelkedés gátlása a P2Y₁₂ receptor agonista 2-methylthio-ADP által a P2Y₁₂ receptorantagonista cangrelor (100nM) jelenlétében és hiányában P2Y₁₂ receptorral transzfektált CHO sejteken. B, A cangrelor hatása a forskolin által kiváltott cAMP szint emelkedésre.



27. ábra A, A forskolin által kiváltott cAMP szint emelkedés gátlása a P2Y₁₂ receptor agonista 2-methylthio-ADP által MRS2395 (20 μ M) jelenlétében és hiányában CHO sejteken. B, Az MRS2395 (20 μ M) hatása a forskolin által kiváltott cAMP szint emelkedésre P2Y₁₂ receptorral transzfektált CHO sejteken. C. Az MRS2395 (20 μ M) hatása a forskolin által kiváltott cAMP szint emelkedésre ál-transzfektált CHO sejteken.

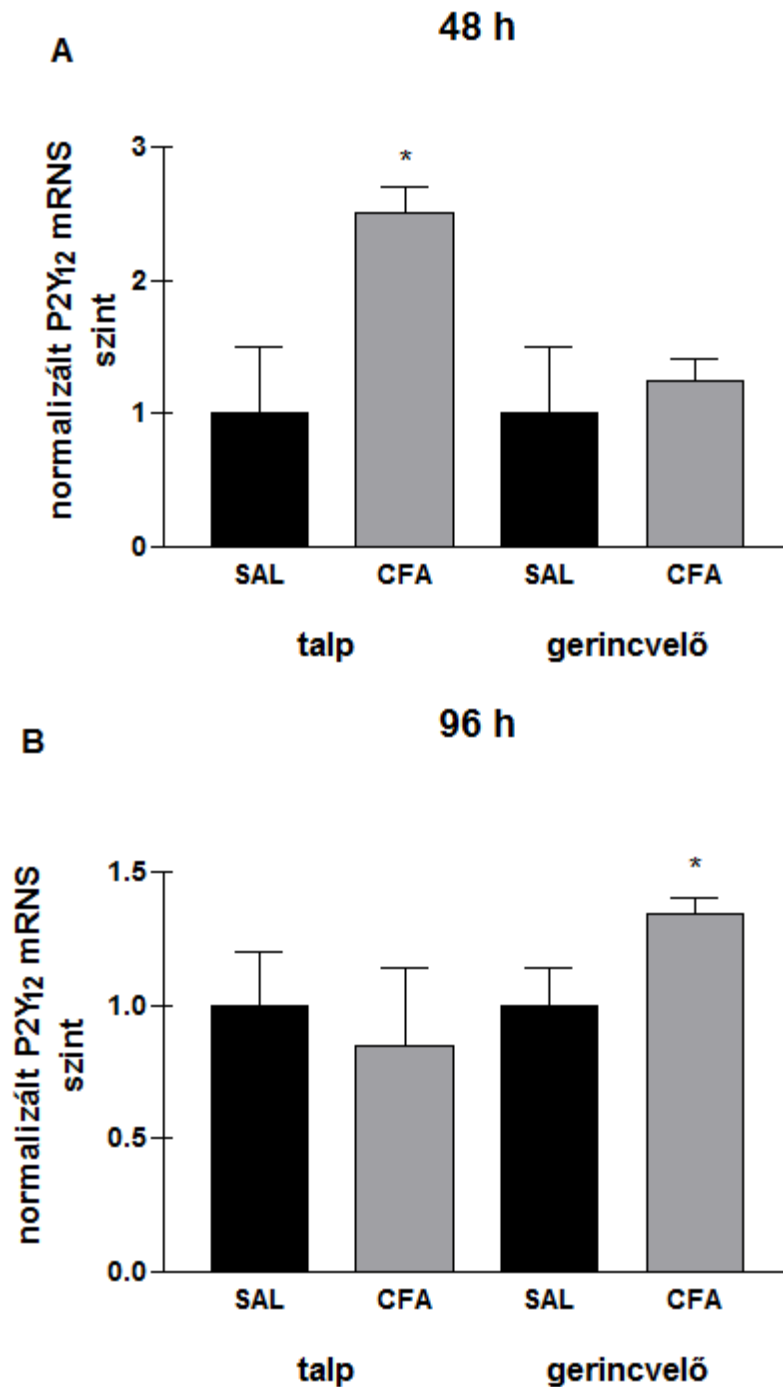
5.3. Háttérmechanizmus vizsgálat

Az *in vivo* fájdalomtesztekben kapott eredmények a P2Y₁₂ receptor különböző típusú fájdalmakban betöltött szerepére utaltak, melyek közül a legmeggyőzőbb adatokat a CFA által indukált gyulladásos fájdalommodellben kaptuk. A P2Y₁₂ szerepét eddig leginkább neuropátiás fájdalomban vizsgálták, a gyulladásos fájdalomban betöltött szerepéről *in vivo* adat nem állt rendelkezésre, ezért hatásmechanizmus vizsgálataink során leginkább a P2Y₁₂ receptor gyulladásos fájdalomban betöltött funkciójára fókuszáltunk. A háttérmechanizmus vizsgálat során olyan kérdésekre kerestünk választ, mint a P2Y₁₂ receptor mRNS expressziójának megváltozása gyulladásos stimulust követően a központi idegrendszerben és a periférián; szerepének tisztázása a gyulladásos citokinek expressziójának szabályozásában a gyulladt szövetben és az gerincvelőben, valamint a *n. vagus* és a szimpatikus rostok, mint potenciális efferens közvetítő mechanizmus azonosítása.

5.3.1. Real-Time PCR a P2Y₁₂ receptor expressziójának meghatározására

A P2Y₁₂ receptor mRNS expressziót a fájdalomkísérletnek megfelelő körülmények közt, fiziológiás sóoldat és CFA emulzió (100 µL, 50%) intraplantáris injekcióját követő 48, illetve 96 órával mértük a gerincvelőben és a gyulladt talpban. A P2Y₁₂ mRNS expressziót normalizáltuk a referencia gén (18S rRNS) expressziójára. A gyulladt perifériás szövetben CFA kezelést követő 48 órával a P2Y₁₂ receptor expresszió a kontroll érték 2.5 szerezére (n=4, p <0.05) emelkedett (**28. ábra**). Ezzel párhuzamosan a gerincvelőben 48 órával a CFA kezelést követően nem tapasztaltunk jelentős változást a P2Y₁₂ mRNS expresszióban (125 ± 17%, n=4, p > 0.05, **28. ábra**). Ettől eltérően alakult az mRNS expresszió a CFA injekciót követő 96. órában: A gerincvelő lumbális L4-L6 szakaszán a kontroll érték 134.45 ± 6.25%-ra történő emelkedését tapasztaltuk (n = 4, p <0.05). Ekkor a gyulladás helyén, a perifériás

szövetben a kontroll érték mindössze $85.02 \pm 29.2\%$ -át detektáltuk, mely nem volt szignifikáns változás ($n = 4$, $p > 0.05$).

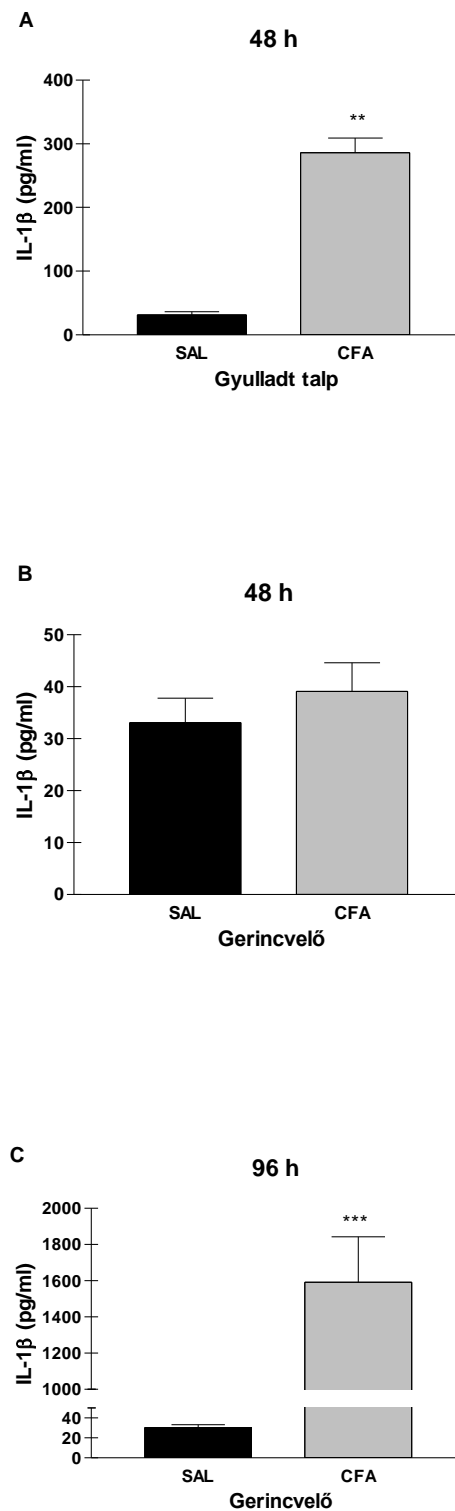


28. ábra P2Y₁₂ mRNS expresszió a hátsó végtagban (talp) és a gerincvelőben fiziológias sóoldat (control) és CFA kezelést követően. Az eredmények 3-4 párhuzamos kísérlet átlagát mutatják. * $p < 0.05$.

5.3.2. A gyulladás időbeli lefutása: IL-1 β produkció mérés a gyulladt talpban és a gerincvelőben 48, illetve 96 órával intraplantáris CFA kezelést követően

A proinflammatorikus IL-1 β szintet ELISA módszerrel határoztuk meg gyulladt talpban és a gerincvelőben 48- illetve 96 órával intraplantáris CFA kezelést követően. Az IL-1 β szint sókezelt patkányokban 48 órával a kezelést követően 31.4 ± 4.7 pg/ml volt ($n=3$). Az ennek megfelelő, 48 órával a CFA kezelést követően mért csoport jelentős IL-1 β szint emelkedést mutatott a sókezelt állatokhoz viszonyítva (286 ± 23 pg/ml; $n=3$, $p < 0.001$, **29. A ábra**). A gerincvelő lumbális szakaszából vett mintákban az IL-1 β szint a sókezelt és CFA kezelt állatokban is hasonló volt 48 órával a kezelést követően (33.1 ± 4.7 pg/ml, $n=3$ illetve 39.1 ± 5.5 pg/ml, $n=3$, $p > 0.05$, **29. B ábra**). Az IL-1 β szintet megmértük ugyanilyen csoportoknál 96 órával is az intraplantáris kezelést követően. Ekkor azt tapasztaltuk, hogy a CFA kezelt csoportban nemcsak a gyulladás helyén, hanem a központi idegrendszerben is jelentősen megemelkedett a proinflammatorikus IL-1 β szint. A sókezelt csoport értéke a gerincvelő L4-L6 közötti területen vételezett mintából 30.6 ± 2.7 pg/ml, míg a CFA kezelt állatok átlagos IL-1 β koncentrációja 1591.6 ± 252.3 pg/ml volt ($n=4$, $p < 0.001$, **29. C ábra**). A perifériás szövetet vizsgálva is egymáshoz képest szignifikáns eltérést tapasztaltunk a két kezelési csoport között (só: 27.9 ± 3.5 pg/ml, $n=4$, CFA: 151.6 ± 13.3 pg/ml, $n=4$, $p < 0.01$). A fenti kísérletsorozat eredményei a szakirodalmi adatokkal korrelálnak, tehát a CFA kezelés által indukált gyulladás esetén a stimulust követő 48 órában lokális citokin válasz mérhető és a szisztémás hatások csak valamivel később, a 72-96 órás intervallumban jelentkeznek (Raghavendra és munkatársai, 2004). A gerincvelő citokinszintjének változása feltehetően a periférián termelődő, a vér-agy gáton átjutni képes szignálok által aktiválódó mikroglia populációk tevékenységének az eredménye. A következő kísérletsorozatokban az általunk vizsgált antagonisták közül célzottan azt a két antagonistát vizsgáltuk, melyek az *in vitro* vizsgálatokban illetve a fájdalommodellekben a legígéretesebbnek tűntek: a potens, P2Y_{12/13} antagonistá cangrelor, illetve a P2Y₁₂ receptor szelektív, potens antagonistá PSB-0739 hatásait. A

kísérletek során gerincvelői mintákat 96 órával a CFA kezelést követően vettünk, ebben az időpontban fájdalomtesztet is végeztünk. A cangrelort 3 mg/kg, a PSB-0739-t 0.3 mg/kg dózisban vizsgáltuk a korábbi kísérleteknek megfelelően 30, illetve 15 perccel a mérés előtt beadva és mindkét vegyületnek szignifikáns antiallodynias hatása volt 96 órával a CFA injekciót követően is, az aznap mért, hatóanyag kezelés előtti értékekhez viszonyítva (Cangrelor 3 mg/kg: 29.05 ± 1.49 , $n=6$, $p<0.001$; PSB-0739 0.3 mg/kg: 34.78 ± 2.66 , $n=5$, $p<0.01$).



29. ábra IL-1 β produkció időbeli változása a gyulladt talpban (A) és a gerincvelő L4-6 szegmensében (B és C) intraplantáris CFA/fiziológiás só injekció hatására. Az IL-1 β szinteket ELISA módszerrel mértük, triplikátumban, 3 különböző állatból vett mintákban 48 és 96 órával a CFA/só kezelést követően. Az eredményeket

pg/ml-ben fejeztük ki (n=3-4, **p <0.01 ***p <0.001. A kísérleti állatokat fiziológiás sóoldattal, illetve CFA-val injektáltuk (100 ml intraplantáris).

5.3.3 Multiplex citokin mérés Luminex platformon

Ezekben a kísérletekben 200-250 g közötti hím Wistar állatokból származó talp és gerincvelő mintákban (L4-L6) vizsgáltuk a citokin produkciót. A talpminták esetében az expozíciót (100 μ L, 50%-os CFA emulzió, illetve ennek kontrolljaként 100 μ L fiziológiás sóoldat) követően 48 órával, a gerincvelői minták esetében 96 óra elteltével vettünk mintát. Ezen túlmenően megvizsgáltuk a cangrelor 3 mg/kg ip. és a PSB-0739 0.3 mg/kg it. dózisait a CFA kezelt csoportokban. A kezelés előtti TNF- α értékek leg többje a talpban a Fluorokine® MultiAnalyte Profiling kit detektálhatósági küszöbértéke alatti maradt, ami MFI=0.00 értéket jelent ebben az esetben. Azért, hogy ezeket az eredményeket statisztikai számításra alkalmassá tegyük, a vizsgálat során mért többi nem detektálható értékkel együtt egy fiktív, 0-hoz közelítő, számszerűen 10⁻⁵ pg/ml detektálási küszöb alatti értékkel helyettesítettük. A gyulladt talpban az intraplantáris CFA kezelés hatására a TNF- α produkció 47.22 \pm 7.17 pg/ml-re emelkedett (n=5, **30. ábra**), amely érték szignifikáns csökkenést mutatott a P2Y₁₂ receptorantagonista kezelés után (cangrelor: 26.40 \pm 6.0 pg/ml, n=5, p <0.05; PSB: 6.40 \pm 3.4 pg/ml, n=5, p <0.01). A gerincvelőben a TNF- α szintje az általunk vizsgált összes mintában a detektálási küszöbérték alatt maradt az összes kezelési csoportban, az eredmények extrapolációjára sem volt lehetőség, ezért azt feltételezzük, hogy a TNF- α szint alacsony koncentrációban volt csak jelen a gerincvelőből vett mintákban.

Az IL-1 β szint az ELISA eredményekhez hasonlóan alakult: az intraplantáris CFA kezelést követően az ödémás talpban robosztus IL-1 β expressziót tapasztaltunk a sókezelt állatokhoz képest (CFA: 11198 \pm 497 pg/ml n=5, SAL: 226 \pm 42.3 pg/ml, p <0.01). A cangrelornak nem volt szignifikáns hatása az IL-1 β produkcióra, ezzel szemben a PSB-0739 jelentős mértékben csökkentette az intraplantáris CFA injekció hatására bekövetkezett IL-1 β produkciót (5646 \pm 1785pg/ml, n=5, p <0.05, **31. ábra**). A gerincvelő IL-1 β szintje a LUMINEX mérések során a következőképpen alakult: az

intraplantáris só csoporthoz képest jelentős emelkedést figyeltünk meg az intraplantáris CFA injekció hatására (só: 45.6 ± 1.88 pg/ml, $n=5$, CFA: 203.6 ± 63.3 pg/ml, $n=5$, $p < 0.001$, $>400\%$ -os növekedés), melyet mindkét potens antagonistá gátolt, gyakorlatilag a só csoport IL-1 β szintjére csökkentett (**32. ábra**). A cangrelor 3 mg/kg intraperitoneálisan 50.4 ± 6.1 pg/ml értékre csökkentette a gerincvelői IL-1 β expressziót ($n=5$, $p < 0.05$), míg a PSB-0739 0.3 mg/kg intrathecalis kezelés 49.8 ± 4.8 pg/ml értékre csökkentette azt ($n=5$, $p < 0.05$). Az akut fázis választ kialakító citokin triád harmadik jelentős képviselője az interleukin-6. A gyulladt perifériás szövetben 48 órával a CFA injekciót követően robosztus emelkedést tapasztaltunk (**33. ábra**, só: 33.5 ± 33.5 pg/ml, $n=5$, CFA: 2576 ± 505.49 pg/ml, $n=5$, $p < 0.01$). A TNF- α szintekhez hasonlóan ezekben a mintákban is igen alacsony, a detektálási küszöb körüli értéket tapasztaltunk, egy eset kivételével, ez okozza az óriási szórást az IL-6 esetében. A cangrelor (3mg/kg, ip.) nem befolyásolta az IL-6 szintet a periférián, ezzel szemben a PSB-0739 (0.3 mg/kg, it.) szignifikáns hatású volt (830 ± 210 pg/ml, $n=5$, $p < 0.05$). A gerincvelő IL-6 mérés eredményei nehezen értékelhetőek. Az intraplantáris CFA injekció hatására markáns emelkedés tapasztalható, de a szórás miatt az emelkedés nem különbözik szignifikánsan a só-csoport értékétől. Gyakorlatilag csoportonként 1-2 mintából lehetett értékelhető adatot szerezni, ezért az átlagolásakor hihetetlen nagy szórások keletkeztek (mivel a detektálási limit alatti értékeket 10^{-6} -nak vettük). A szakirodalmi adatok alapján (Raghavendra és munkatársai, 2004) elképzelhető, hogy a különbségek az egyes állatok egyéni citokin értékei között azért ilyen jelentősek, mert egyéni eltérő időintervallumokban érheték el a citokin emelkedés maximumát. Mivel a kaszkádban korábban megjelenő IL-1 β szintek a vártak megfelelő tartományba estek és a fájdalomtesztekben is az IL-1 β -val párhuzamosan változó végtagelelirántási küszöbértékeket tapasztaltunk, ezt a magyarázatot elfogadhatónak tekintjük.

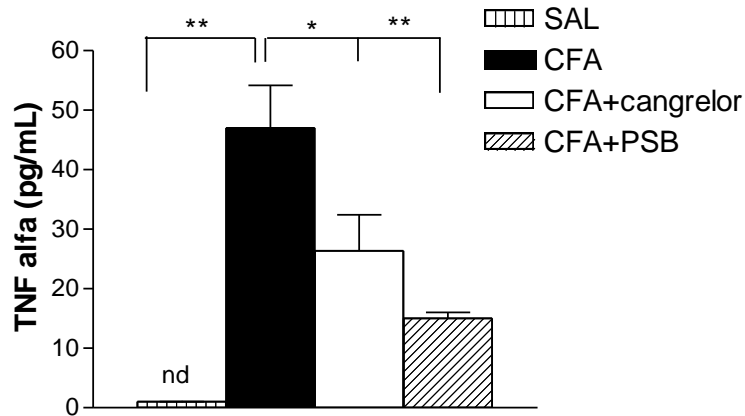
Az általunk vizsgált negyedik citokin az anti-inflammatorikus IL-10 volt. Intraplantáris sókezelést követően 48 órával történő mintavételezéskor az alap IL-10 szint 4.91 ± 1.42 pg/ml volt (**34. ábra**); CFA kezelést követően jelentősen megemelkedett IL-10 szintet tapasztaltunk (25.0 ± 2.88 pg/ml, $n=5$, $p < 0.001$). A cangrelor (3mg/kg, ip.) és a P2Y₁₂ receptor szelektív antagonistá PSB-0739 egyaránt csökkentette az IL-10 szintet a perifériás gyulladt szövetben (cangrelor: 15.13 ± 3.73 $n=5$, $p < 0.05$; PSB: 7.1 ± 1.27 , $n=5$, $p < 0.001$). A gerincvelőben 96 órával az intraplantáris fiziológiás sóoldattal való

kezelést követően az IL-10 szint 3.93 ± 0.98 pg/ml volt (**35. ábra**, $n=5$); a CFA kezelés után ugyancsak 96 órával vett minták nem különböztek a sókezelt mintáktól (5.53 ± 0.62 pg/ml, $n=5$, $p > 0.05$). Az általunk tesztelt antagonisták nem befolyásolták a gerincvelői IL-10 termelést, tehát az IL-10 produkció független a CFA, illetve az azt követő antagonisták kezelésektől.

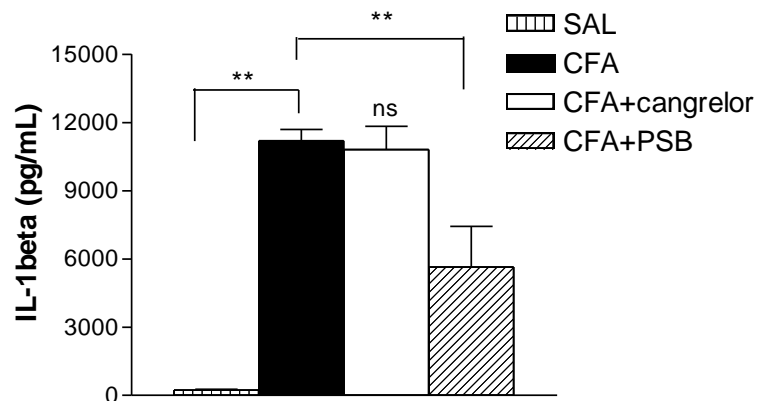
A három akut fázis reakciót kialakító citokin közül a TNF- α -ról és az IL-1 β -ről tudjuk, hogy monocita-makrofág vonalba tartozó sejtek termelik. Az IL-6 mononukleáris fagociták, bizonyos endothél sejtek, fibroblasztok valamint aktivált T-sejtek terméke, mely az IL-1 β -t és a TNF- α -t követően és azok hatására termelődik és az akut fázison túlmutató T, illetve B sejt differenciációt és ellenanyag termelést befolyásolja. A gyulladt talpban 48 órával a CFA kezelést követően jelentős mértékű emelkedést mértünk mind a négy általunk vizsgált citokin mennyiségében. A cangrelor képes volt a TNF- α termelődését gátolni, a többi proinflammatorikus citokin szintézisére azonban nem volt hatással a perifériás gyulladt szövetben. Ezzel szemben a centrálisan adagolt potens és szelektív P2Y₁₂ receptorantagonista PSB-0739 mind a négy citokin termelődését csökkentette a gyulladás helyszínén. A gerincvelőben mért citokin mennyiségi elemzése során megállapítható, hogy a talpba adott CFA kezelés egyedül az IL-1 β esetében okozott olyan változást, ami megbízhatóan mérhető volt. Az IL-1 β klasszikus pleiotrop hatású citokin, lokálisan és szisztémásan egyaránt ható faktor. A P2Y₁₂ receptor antagonisták analgetikus hatása összefüggésben állhat az IL-1 β expresszióra gyakorolt hatással, mert a cangrelor és a PSB-0739 is gátolta az IL-1 β expressziót. Az IL-6 és TNF- α esetében azonban ez nem állítható egyértelmű bizonyossággal, hiszen a központi idegrendszerben ezen citokinek mennyisége a detektálási küszöbérték alatt volt, ezért valós statisztikai elemzésük nem volt lehetséges. A potens és szelektív P2Y₁₂R antagonistá PSB-0739 a perifériás gyulladt szövetben minden esetben jelentős mennyiségben csökkentette az általunk vizsgált proinflammatorikus citokinek mennyiségét. Ezt a hatását központi adagolásnál tapasztaltuk, tehát valószínűsíthető, hogy egy centrális kiindulópontú, gyulladásgátló szignalizációs útvonal modulálásával fejt ki ezt a hatását.

A gyulladáscsökkentő hatású IL-10 produkcióját az általunk vizsgált 48-96 órás időintervallumban sem a CFA kezelés, sem pedig a P2Y₁₂R antagonisták nem befolyásolták, ezért azt gondoljuk, hogy a cangrelor és a PSB-0739 citokinszintet

befolyásoló hatása nincs összefüggésben ezeknek a vegyületeknek a fájdalomcsillapító hatásával (4. táblázat, 93. oldal).

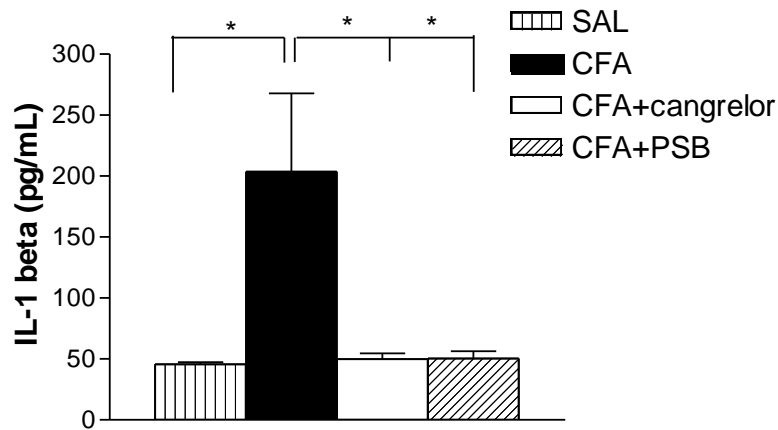


30. ábra A CFA hatása a TNF- α produkcióra patkány talpban P2Y₁₂ receptor antagonisták jelenlétében és hiányában. A kísérleti állatokat fizioológias sóoldattal, illetve CFA-val (Complete Freund's Adjuvant) injektáltuk (100 μ L intraplantárisan), majd a TNF- α szintet Luminex-xMAP multiplex array platformon határoztuk meg 48 órával a CFA kezelést követően. Az eredményeket pg/ml-ben fejeztük ki (n=5, **p < 0.01, ***p < 0.001).

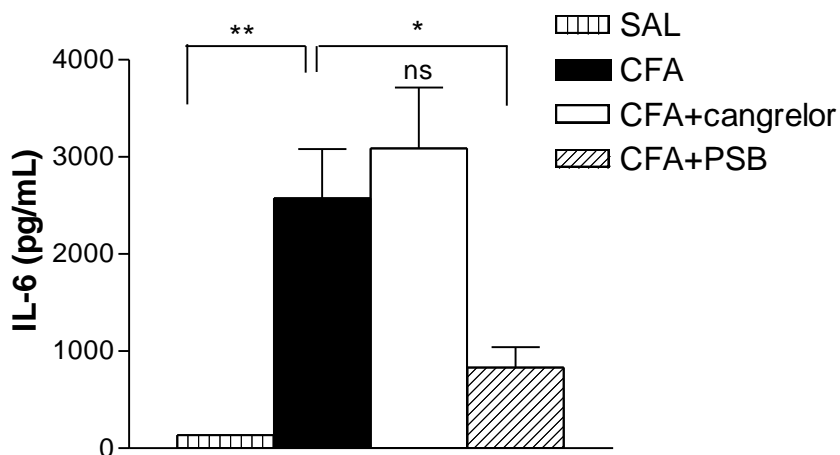


31. ábra A CFA (Complete Freund's Adjuvant) hatása az IL-1 β produkcióra patkány talpban P2Y₁₂ receptor antagonisták jelenlétében és hiányában. A kísérleti állatokat fizioológias sóoldattal, illetve CFA-val injektáltuk (100 μ L intraplantárisan), majd az IL-1 β szintet Luminex-xMAP multiplex array platformon

határoztuk meg 48 órával a CFA kezelést követően. Az eredményeket pg/ml-ben fejeztük ki (n=5, ns. $p > 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

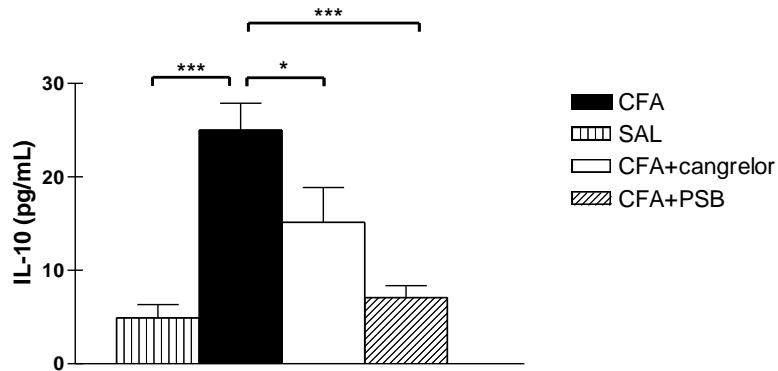


32. ábra A CFA (Complete Freund's Adjuvant) hatása az IL-1 β produkcióra patkány gerincvelői L4-6 szakaszon vett mintákban, P2Y₁₂ receptor antagonisták jelenlétében és hiányában. A kísérleti állatokat fizioológias sóoldattal, illetve CFA-val injektáltuk (100 μ L intraplantáris), majd az IL-1 β szintet Luminex-xMAP multiplex array platformon határoztuk meg 96 órával a CFA kezelést követően. Az eredményeket pg/ml-ben fejeztük ki (n=5, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

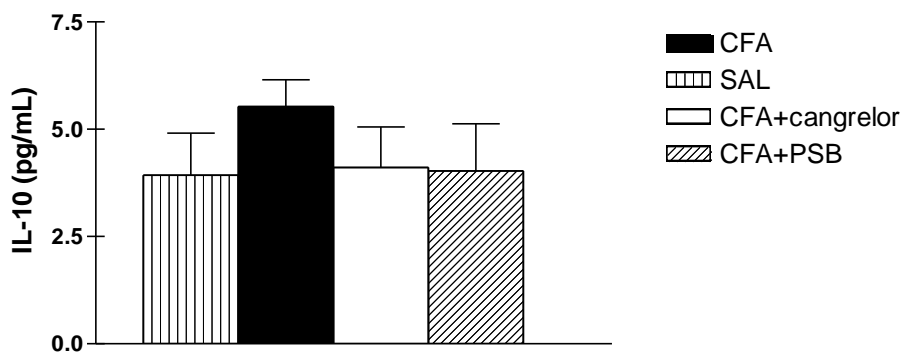


33. ábra A CFA (Complete Freund's Adjuvant) hatása az IL-6 produkcióra patkány talpban P2Y₁₂ receptor antagonisták jelenlétében és hiányában. A kísérleti állatokat fizioológias sóoldattal, illetve CFA-val injektáltuk (100 μ L

intraplantáris), majd az IL-6 szintet Luminex-xMAP multiplex array platformon határoztuk meg 48 órával a CFA kezelést követően. Az eredményeket pg/ml-ben fejeztük ki (n=5, ns. $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).



34. ábra A CFA (Complete Freund's Adjuvant) hatása az IL-10 produkcióra patkány talpán P2Y₁₂ receptor antagonisták jelenlétében és hiányában. A kísérleti állatokat fiziológiás sóoldattal, illetve CFA-val injektáltuk (100 μ L intraplantáris), majd az IL-10 szintet Luminex-xMAP multiplex array platformon határoztuk meg 48 órával a CFA kezelést követően. Az eredményeket pg/ml-ben fejeztük ki (n=5, ns. $p > 0.05$, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

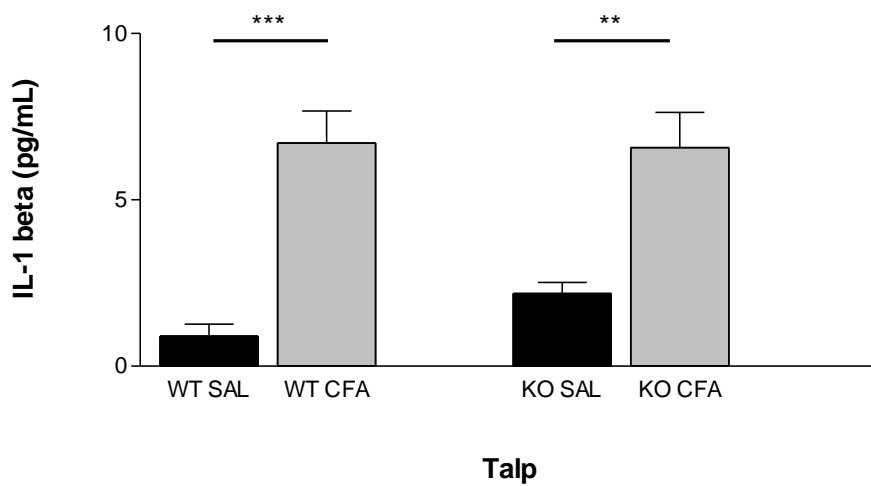
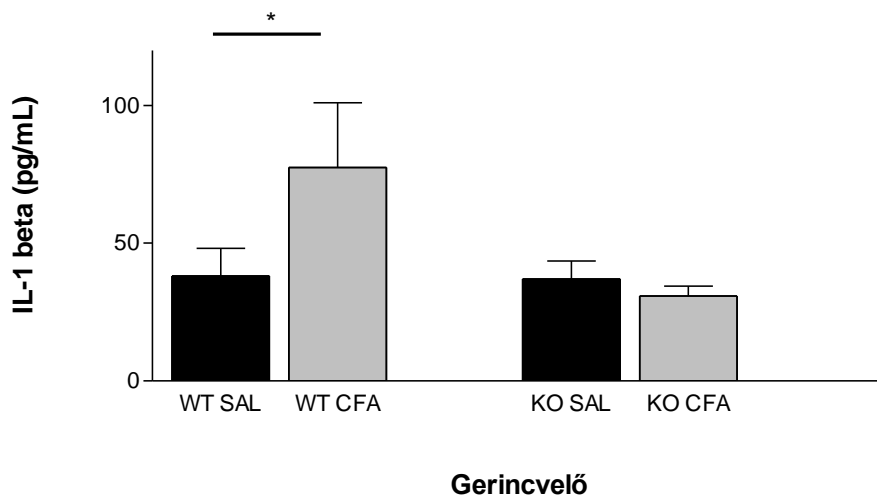


35. ábra A CFA (Complete Freund's Adjuvant) hatása az IL-10 produkcióra patkány gerincvelőben P2Y₁₂ receptor antagonisták jelenlétében és hiányában. A kísérleti állatokat fiziológiás sóoldattal, illetve CFA-val injektáltuk (100 μ L

intraplantáris), majd az IL-10 szintet Luminex-xMAP multiplex array platformon határoztuk meg 96 órával a CFA kezelést követően. Az eredményeket pg/ml-ben fejeztük ki (n=5).

5.3.4. P2Y₁₂ receptor génkiütés IL-1 β szintet befolyásoló hatása

Az *in vivo* fájdalomtesztek után mintát vettük knock-out és vad típusú egerek L4-6 lumbális gerincvelői szegmenseiből, valamint a gyulladt talpból és megmértük a szövetek IL-1 β tartalmát. A perifériás szövetben CFA hatására proinflammatorikus IL-1 β szint emelkedését tapasztaltuk, genotípustól függetlenül, egymást követő több mérés során, ELISA, valamint FACS módszerrel egyaránt (FACS: WT-SAL: 0.91 \pm 0.35 pg/ml, n=5; WT-CFA: 6.7 \pm 0.97 pg/ml, n=6; KO-SAL 2.18 \pm 0.33, n=6; KO-CFA: 6.57 \pm 1.06, n=6; ANOVA $F_{\text{genotípus} \times \text{kezelés}}(1, 19)=107.5$, WT-SAL-WT CFA: $p<0.001$, KO-SAL – KO-CFA: $p<0.01$). A gerincvelői IL-1 β az intraplantáris sókezelt vad típusú (+/+) állatokban 38.17 \pm 9.98 pg/ml volt. Intraplantáris CFA kezelés hatására az IL-1 β szint 77.53 \pm 23.47 pg/ml koncentrációra emelkedett, ami szignifikáns eltérés volt ($p < 0.05$, n = 5) az intraplantáris sókezeléshez viszonyítva. A P2Y₁₂ receptor génkiütött egerek esetében a sókezelt alapérték 37.07 \pm 6.50 pg/ml volt; ebben a csoportban az intraplantáris CFA injekció nem okozott szignifikáns IL-1 β szintemelkedést, tehát a KO állatok intraplantáris CFA kezelést követően mért IL-1 β szintje eltérő volt a vad típusúakétól (**36. ábra**, ANOVA genotípus x kezelés $F_{1,34} = 42.72$, $p < 0.001$).



36. ábra Gerincvelői Interleukin-1 béta szint a CFA kezelés hatására P2Y₁₂ receptor génkiütött (KO) és vad típusú állatokban (WT). A mintákat 96 órával az intraplantáris CFA, illetve só kezelés után vettük a megfelelő gerincvelői szegmensből (L4-L6). * $p < 0.05$, szignifikáns eltérés a sókezelt, azonos genotípusú értékhez viszonyítva.

5.3.5. Az efferens hatásmechanizmus vizsgálata

Eddigi kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy a centrális adagolású potens és szelektív antagonistá PSB-0739 szignifikáns hatást gyakorolt a perifériás gyulladt szövet citokin termelésére. A gyártótól kapott információk alapján a PSB molekuláris struktúrájának köszönhetően nem képes penetrálni a vér-agy gáton. Saját kísérletes tapasztalataink ezzel egybevágóak, mert a szisztémásan adagolt PSB-0739 nem volt hatékony az általunk vizsgált fájdalommodellekben, centrális adagolásnál ehhez képest jelentős hatást tapasztaltunk. A gerincvelői adagolás eredményeképpen megjelenő perifériás citokin szintekben mérhető válasz indirekt hatást sejtet, amit az alábbi kísérletsorozattal próbáltunk felderíteni. Először a szimpatikus efferens rostok blokkolását végeztük el szisztémás 6-hidroxi-dopamin (6-OHDA) kezeléssel. A 6-OHDA-t 0.1%-os aszkorbinsav oldatban vettük fel és 5 napon át kétnaponta (1. nap: 40 mg/kg, 2. nap: 60 mg/kg, 3. nap: 60 mg/kg) intraperitoneálisan adagoltuk az állatoknak. Kontrollként azonos térfogatú intraperitoneális fiziológiás sóoldatot adtunk egy-egy csoport állatnak. Az utolsó 6-OHDA injekciót követő napon az állatok intraplantáris CFA illetve fiziológiás sóoldattal történő kezelést kaptak (100 μ L, 50%-os oldat, illetve 100 μ L SAL) és 48 órával később a mechanikus hiperalgéziát/allodyniát a von Frey készülékkel mértük fel azokkal a paraméterekkel, amikkel a korábbi kísérleteinket is végeztük. Ezt követően az állatok intrathecalis adagolással 0.3 mg/kg dózisban PSB-0739-et kaptak és 15 perccel az antagonistá kezelést követően ismét megmértük a végtagelrántási küszöbértéket. A viselkedésvizsgálatokat követően a 6-OHDA kezelés eredményeként a szimpatikus idegvégződésekből bekövetkező noradrenalin csökkenés nyomkövetését a kezelt talpból vett minták katekolamin tartalmának mérésével ellenőriztük. A HPLC analízis eredményeként megállapítható, hogy a mintákban noradrenalin és metabolitjai, a normetanephine és a 3,4-dihydroxyphenylglycol (DOPEG) mennyisége minimálisra csökkent a 6-OHDA kezelt csoportban a sókezelés csoportéhoz képest.

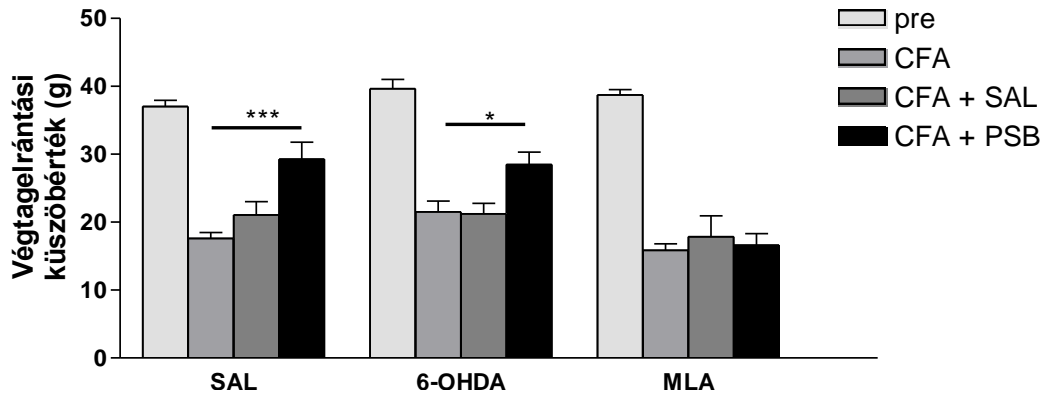
A 6-OHDA kezelés nem befolyásolta a bazális fájdalomküszöböt (39.66 \pm 1.340, n=5, p> 0.05, **37. ábra**, **42. ábra**) illetve a CFA kezelés után 48 órával bekövetkező gyulladási küszöbcsökkenés mértékét sem (2.52 \pm 1.59, n=5, p> 0.05). Az intrathecalis sókezelésnek nem volt hatása a fájdalomküszöbre (21.24 \pm 1.51, n=10, p> 0.05), de a PSB-0739 szignifikáns antiallodyniás hatással bírt ebben a kísérletben (28.48 \pm 1.830,

n=5, p <0.05). Ebből arra következtethetünk, hogy a PSB-0739 az antiallodyniás hatását nem a szimpatikus efferens rostokon keresztül fejt ki.

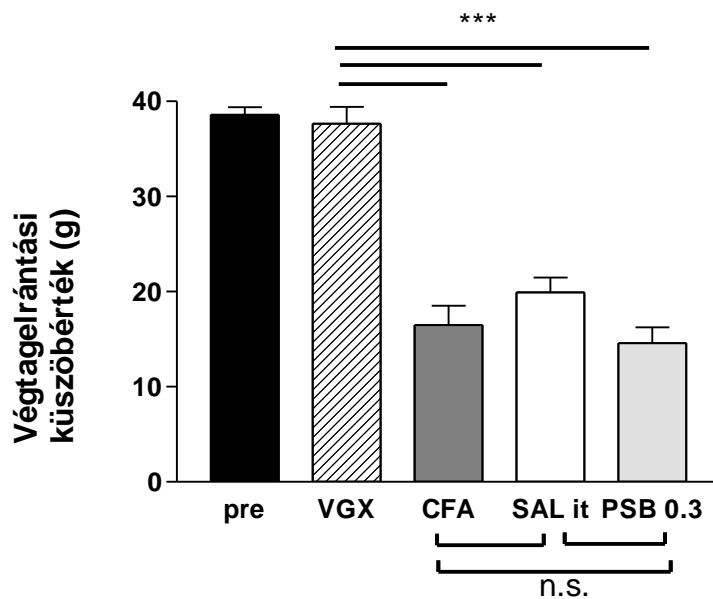
Az $\alpha 7$ nikotinos acetilkolin receptor ($\alpha 7$ nAChR) aktivációja egy másik lehetséges gátló mechanizmusa a gyulladáshoz és neuropátiás hiperszenzitivitásnak (Loram és munkatársai, 2012; Medhurst és munkatársai, 2008), ezért megvizsgáltuk a P2Y₁₂ receptorantagonista PSB-0739 hatását az $\alpha 7$ nAChR antagonistá MLA (3 mg/kg) jelenlétében. A CFA kezelést követően 48 órával az állatok intraperitoneális MLA, illetve sókezelést kaptak, melynek a hatását 45 perccel később mértük meg. Az MLA kezelés önmagában nem befolyásolta a csökkent végtagelrántási küszöbértékeket (**37. ábra, 42. ábra**, 15.86 ± 0.95 , n=10, p > 0.05) és az MLA kezelés felfüggesztette a P2Y₁₂ receptorantagonista PSB-0739 antihyperalgéziás hatását (16.62 ± 1.70 , n=5, p > 0.05). A fájdalomtesztet követően mintát vettünk a perifériás gyulladt szövetből és megmértük az IL-1 β és TNF- α szinteket ezekben a szövetekben. Az MLA kezelés hatására a P2Y₁₂ receptorantagonista PSB-0739 nem befolyásolta a gyulladáshoz citokinek szintjét, tehát a citokin szintek a végtagelrántási küszöbértékekkel párhuzamosan változtak. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az általunk alkalmazott centrális adagolású potens és szelektív antagonistá a hatását kolinerg efferens rostokon keresztül fejt ki.

A farmakológiai anti-kolinerg terápia során tapasztalt jelenség megerősítése céljából megvizsgáltuk a subdiaphragmaticus vagotómia hatását a PSB-0739 által kiváltott végtagelrántási küszöbemelkedésre az általunk alkalmazott gyulladáshoz fájdalommodellben. A bolygóideg efferens hatásáról szakirodalmi adatok is rendelkezésünkre álltak. Borovikova és munkatársai illetve Pavlov és munkatársai leírták már a perifériás gyulladt szövet citokin szintjének a disztális vagus ideg elektromos ingerlésére bekövetkező változását (Borovikova és munkatársai, 2000; Pavlov és munkatársai, 2003). A végtagelrántási küszöbértéket felmértük a vagotómia előtt, valamint 10 nappal a műtétet követően és nem tapasztaltunk változást a PWT értékekben, tehát a vagotómia önállóan nem befolyásolja a fájdalomküszöb értékét (**38. ábra, 42. ábra**, 38.6 ± 0.8 g, n = 10 illetve 37.66 ± 1.75 g, n=10, p > 0.05 cikk ábra). A műtétet követő tizedik napon, a gyulladáshoz modellben leírtak szerint CFA-t, illetve fiziológiás sóoldatot injektáltunk az állatok jobb hátsó lábába, aminek hatására 48 órával később a végtagelrántási küszöbérték robusztus csökkenését tapasztaltuk a CFA kezelt csoportban (16.48 ± 2.05 , n=10, p <0.001). Az intrathecalisan adagolt fiziológiás

sóoldatnak, illetve a P2Y₁₂ receptorantagonista PSB-0739-nek nem volt anti-allodyniás hatása a vagotomizált állatokon (sókezelte csoport: 19.93±1.56, n=4, p> 0.05 CFA értékhez viszonyítva; PSB kezelt állatok: 14.57±1.67, n=6, p> 0.05 a CFA kezelt csoport értékhez viszonyítva).



37. ábra Efferens farmakológiai blokádi hatása a P2Y₁₂ receptor szelektív antagonistá PSB-0739 antiallodyniás hatására. A méréseket a kezelés előtt (pre), illetve 48 órával a CFA kezelést követően végeztük el. A PSB-0739-et 15 perccel a mérés előtt intrathecalisan adagoltuk 5 µL-es térfogatban 0.3 mg/mL-es dózisban, 6-OHDA, MLA, illetve kontrollként só előkezelést követően. ***p <0.001, *p <0.05 szignifikáns eltérés a CFA kezelés előtti értékhez viszonyítva. N=5-10/csoport



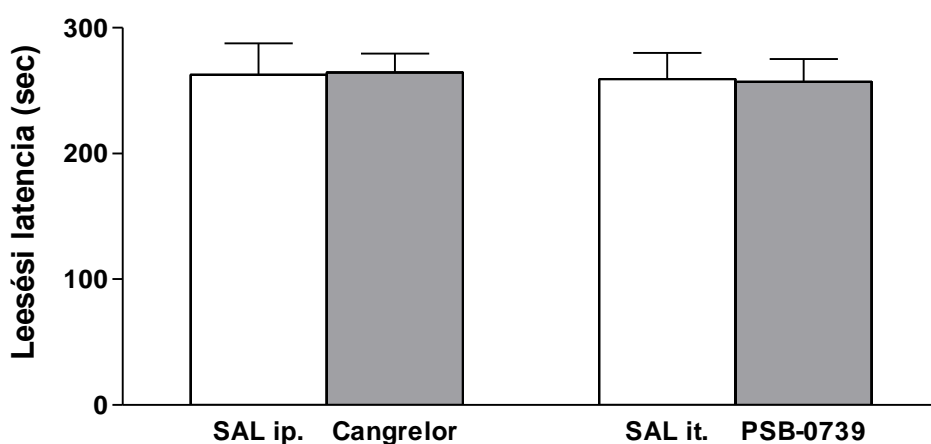
38. ábra Subdiaphragmaticus vagotómia (VGX) hatása a P2Y₁₂ receptor szelektív antagonistá PSB-0739 antiallodyniás hatására. A vagotómia önálló, esetleges nocifenzív viselkedést befolyásoló hatását felmértük műtét előtti (pre) és vagotómia utáni (VGX) méréssel. A CFA hatását 48 órával az intraplantáris CFA kezelést követően mértük meg (CFA). A PSB-0739 illetve a fiziológiás sóoldatot 15 perccel a mérés előtt intrathecalisan adagoltuk 5 µL-es térfogatban 0.3 mg/ml-es dózisban. *p <0.001, ns. p> 0.05 szignifikáns eltérés a CFA kezelés előtti értékhez viszonyítva. N=5-10/csoport.**

5.4. Mellékhatás vizsgálatok

Az *in vitro* vizsgálatok, illetve a fájdalomteszteket követő hatásmechanizmus keresés után megvizsgáltuk a cangrelor és a PSB-0739 mozgáskoordinációra, illetve trombocita aggregációra gyakorolt lehetséges hatásait. Mindkét antagonistá esetében a fájdalomtesztekben hatékonyan bizonyuló dózist és adagolási módot választottuk (cangrelor 3 mg/kg intraperitoneálisan, PSB-0739 0.3 mg/kg intrathecalisan).

5.4.1. Mozgás koordinációs teszt (Rotarod)

A cangrelort a kísérlet előtt 30 perccel adtuk az állatoknak, a PSB-0739-nél az intrathecalis adagolás miatt ez az idő 15 perc volt. A tesztperiódus 300 másodperc volt, az általunk vizsgált antagonisták közül egyik sem befolyásolta a leesési látencia értékeket (**39. ábra**, fiziológiás só intraperitoneális adagolással: 262.70±24.9, n=10; cangrelor: 263.10±22.80 s, n=10; fiziológiás só intrathecalis adagolással: 259.0±21.23, n=9; PSB-0739: 258.0± 20.63 s, n=9; p> 0.05).



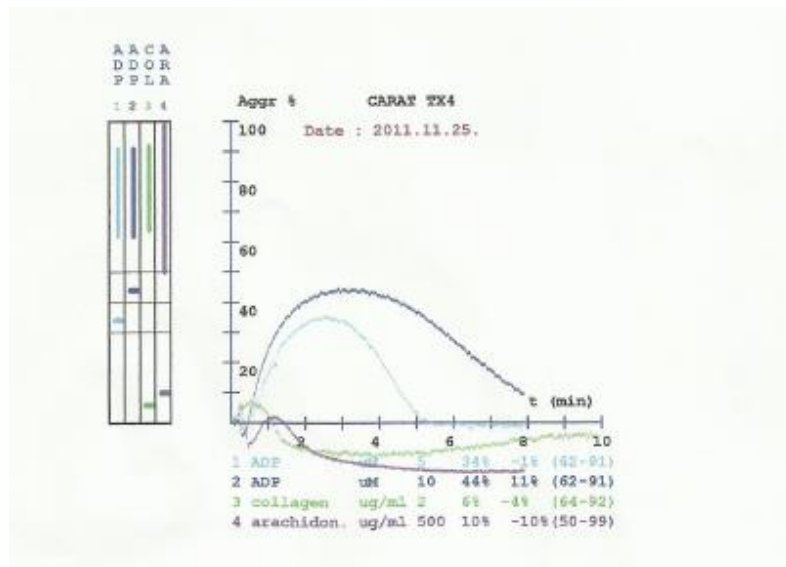
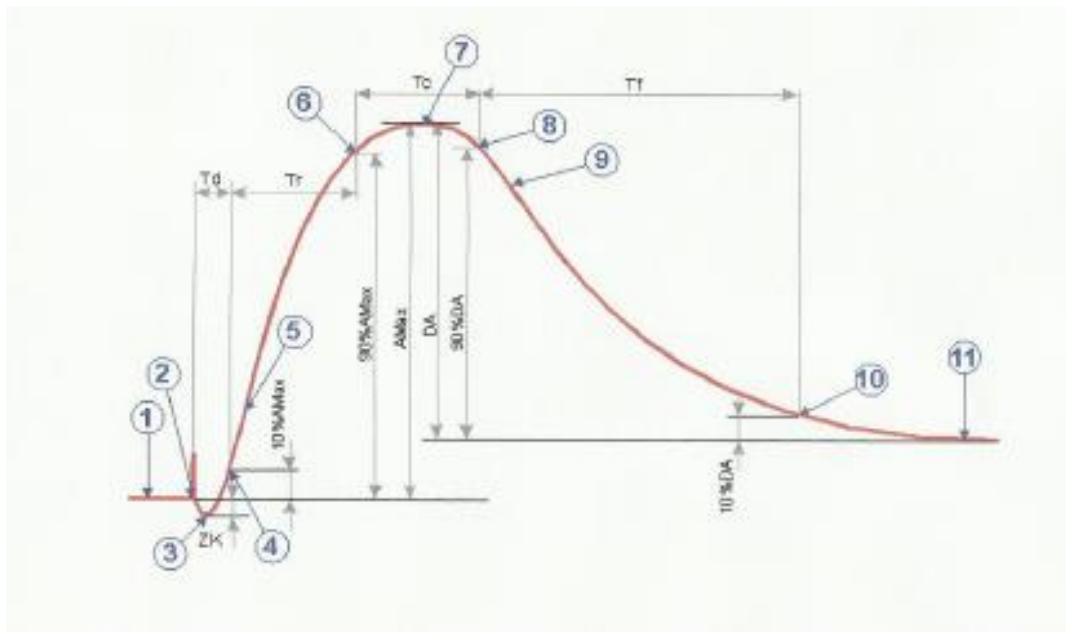
39. ábra A cangrelor (ip. 3 mg/kg) és a PSB-0739 (it. 0.3 mg/kg) hatása a rotarod tesztben. A cangrelort 30 perccel a vizsgálat előtt injektáltuk ip. a kísérleti állatokba (n=10, $p > 0.05$ a sócsoporthoz viszonyítva). A PSB-0739-t 15 perccel a vizsgálat előtt injektáltuk it. a kísérleti állatokba (n=9, $p > 0.05$ a só csoporthoz viszonyítva).

5.4.2. Trombocita aggregáció vizsgálata *ex vivo*

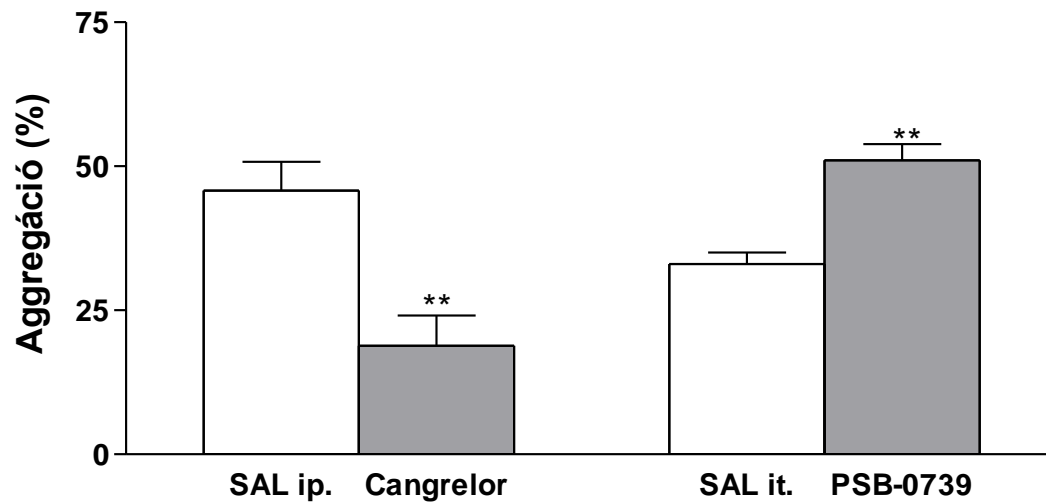
Az *ex vivo* trombocita aggregáció gátlás mérésekor a cangrelort és a PSB-0739-t vizsgáltuk meg az analgesia kísérletekben hatékonyan bizonyuló dózisban és adagolási móddal. Kísérleteinkben ADP-vel indukáltunk trombocita aggregációt, az aggregáció mértékének kifejezésére a maximális aggregáció mértékét (A_{max}) vettük figyelembe (**40. ábra**)

Naiv állatokban az ADP (5-10 μM) koncentrációtól függően indukálta a trombocita aggregációt (**40. ábra**). 10 μM ADP-vel indukált maximális trombocita aggregáció $49.5 \pm 2.96\%$ (n=4) volt, melyhez hasonló eredményt tapasztaltunk fiziológiás sóoldat intraperitoneális adagolását követően 30 perccel ($45.78 \pm 5.00\%$, n=9). A cangrelor 3 mg/kg intraperitoneális dózisa szignifikánsan csökkentette az A_{max} mértékét (18.83 ± 5.28 , n=12 $p < 0.01$, **41. ábra**). A PSB-0739 (0.3 mg/kg it.) szignifikánsan fokozta a trombocita aggregáció mértékét az intrathecalisan adagolt sóoldathoz

viszonyítva ($51.00 \pm 2,86$, $n=4$, $p < 0.01$, **32. ábra**), melynek oka lehet például az, hogy az antagonisták nem jutottak be a szisztémás keringésbe. A cangrelorral kapott eredmények korrelálnak a P2Y₁₂R antagonisták antiaggregáns hatásait bemutató közlemények adataival (Schumacher és munkatársai, 2007), ami kardiovaszkuláris rizikó szempontjából inkább előnyös hatású.



40. ábra A trombocita aggregáció görbe jellemző paramétereit. Kísérleteinkben az aggregáció mértékénél a maximális aggregáció mértékét (A_{max}) vettük figyelembe (felső görbe). Az ADP (5-10 μM) által kiváltott trombocita aggregáció naiv patkány vérmintán. Eredeti regisztrátum az aggregométerből.



41. ábra A cangrelor és a PSB-0739 hatása az ex vivo ADP (10 μ M) által kiváltott trombocita aggregációra. A kísérleti állatokat fizioológias intraperitoneális illetve intrathecalis fizioológias sóoldattal, valamint cangrelorral (3 mg/kg, ip.) és PSB-0739-el (0.3 mg/kg it.) kezeltük. n=4-9/ csoport, **p < 0.01).

6. Megbeszélés

A fájdalom csillapítása szakterületől függetlenül alapvető fontosságú az orvostudományban. Ebben a tanulmányban a P2Y₁₂ receptor fájdalomban betöltött szerepét összetett módon, molekuláris biológiai és *in vivo* viselkedésfarmakológiai technikák segítségével derítettük fel. Eredményeink igazolták a P2Y₁₂ receptor részvételét különböző típusú fájdalmakban és a vizsgált antagonisták lehetséges hatásmódja is körvonalazódott a kísérleteink során.

6.1. P2Y₁₂ antagonisták hatásának vizsgálata különböző rágsáló fájdalommodellekben

Az *in vivo* viselkedésfarmakológiai vizsgálatok során az általunk tesztelt antagonisták dózis-hatás görbéit vettük fel és hasonlítottuk egymáshoz akut termális fájdalom, neuropátiás fájdalom és CFA által indukált gyulladásos fájdalommodellben, mely modelleket a laboratóriumban korábban már beállítottunk. A különböző fájdalommodellekben eltérően hatottak a különböző antagonisták.

Az emelkedő hőmérsékletű hot plate tesztben az általunk vizsgált hatóanyagok közül négy vegyület volt hatékony. A PSB-0739 dózis független hatással bírt, a többi három vegyület esetén dózisfüggést tapasztaltunk. A reactive blue 2 és a cangrelor nem voltak hatékonyak ebben a fájdalom modellben. Az akut fájdalomteszt eredményeivel kapcsolatban érdemes megjegyezni, hogy ez a típusú fájdalom elsősorban szöveti sérüléseket követően jelentkezik, enyhítése fontos, de teljes megszüntetése nem célszerű.

A neuropátiás fájdalommodellben az ülőideg részleges lekötését végeztük el az egyik oldali végtagon. A végtagelrántási küszöbértéket a beavatkozás előtt, illetve egy héttel a műtétet követően mértük. Ekkor mértük meg a vegyületek hatását is. Ebben a modellben öt antagonistának volt szignifikáns hatása a műtétet követő csökkent végtagelrántási küszöbértékre. A dózis-hatás görbék kisebb meredekséget mutattak. Ez alól a ticlopidine kivétel, ami jelentős hatással bírt az általunk legnagyobb vizsgált dózisban. A reactive blue 2 hatástalannak bizonyult.

A CFA által kiváltott gyulladási fájdalommodellben az általunk vizsgált összes antagonisták szignifikáns hatású volt. A leghatékonyabb a P2Y₁₂ receptorszelektív antagonisták PSB-0739 és a P2Y_{12/13} antagonisták cangrelor voltak. Ebben a modellben felmértük az ödéma mértékét, illetve az antagonisták ödémára gyakorolt hatását is. Az általunk vizsgált hatóanyagok közül egyedül a ticlopidine-nek volt hatása az ödéma térfogatára.

A PSB-0739-ről azt az információt kaptuk a gyártótól, hogy szerkezeti sajátosságának köszönhetően nem képes átjutni a vér-agy gáton, ezért kétféle adagolással, intraperitoneális és intrathecalis adagolással is megmértük az antagonisták hatását. Valóban, intraperitoneális adagolásakor nem tapasztaltunk fájdalomcsillapító hatást, míg intrathecalisan az általunk vizsgált antagonisták közül a PSB-0739 bizonyult a leghatékonyabbnak mindhárom fájdalommodellben.

1. táblázat P2Y₁₂ receptorantagonisták hatása különböző fájdalommodellekben

Fájdalom modell	MRS2395	ticlopidine	clopidogrel	reactive blue 2	cangrelor	PSB-0739
Akut fájdalom	Dózisfüggő	Dózisfüggő	Dózisfüggő	-	-	Dózis független
Gyulladási fájdalom	Dózisfüggő	Dózisfüggő	Dózisfüggő	Dózisfüggő	Dózisfüggő	Dózisfüggő
Neuropátiás fájdalom	Dózisfüggő	Dózisfüggő	Dózisfüggő	-	Dózisfüggő	Dózisfüggő

2. táblázat P2Y₁₂ receptorantagonisták hatáserevégi sorrendje a minimális hatékony dózis alapján

Fájdalom modell	Rangsor (mED alapján)
Akut fájdalom	PSB-0739 it. > MRS2395> clopidogrel> ticlopidine
Gyulladási fájdalom	PSB-0739 it. = cangrelor> reactive blue2> MRS2395> ticlopidine = clopidogrel
Neuropátiás fájdalom	PSB-0739 it.= cangrelor> MRS2395> clopidogrel> ticlopidine

A szakirodalomban ugyan már megtalálhatóak a P2Y₁₂ receptor és fájdalom kapcsolatával foglalkozó tanulmányok, melyek neuropátiás és akut fájdalommodellben vizsgálták a P2Y₁₂ receptor részvételét (Kobayashi és munkatársai, 2006; Kobayashi és munkatársai, 2008; Tozaki-Saitoh és munkatársai, 2008). Ismert volt, hogy az ülőideg részleges lekötését követően patkány gerincvelői mikroglia sejteken fokozódik a P2Y₁₂ receptor mRNS expresszió. Ebben a modellben megvizsgálták az MRS2395, illetve P2Y₁₂R antiszensz oligonukleotid fájdalomcsillapító hatását. Ezen túlmenően a termális hiperalgéziára gyakorolt hatását is leírták (Kobayashi és munkatársai, 2008).

A korábbi kísérletes adatokat áttekintve célunk egy olyan összehasonlító farmakológiai vizsgálat elvégzése volt, melynek során különböző specificitású illetve affinitású antagonistákat vizsgálunk meg többféle fájdalommodellben. Kiemelten fontos volt, hogy a P2Y₁₂ receptor gyulladáson alapuló fájdalomban betöltött szerepét megvizsgáljuk, mert erre vonatkozó szakirodalmi adat korábban nem állt rendelkezésre.

A vegyületek *in vitro* és *in vivo* hatása kísérleteink során egymással szorosan korrelált, eredményeink szerint a P2Y₁₂ receptor farmakológiai gátlása *in vivo* fájdalomcsillapításhoz vezet neuropátiás, akut termális és CFA által indukált gyulladáson alapuló fájdalom esetén egyaránt. A különböző szelektivitású és affinitású P2Y₁₂ receptor antagonisták eltérő hatékonyságúak voltak az általunk vizsgált modellekben, de a P2Y₁₂R potens és szelektív antagonistája PSB-0739 nemcsak hatékony, de az összes antagonisták közül a leghatékonyabb volt, ami azt a feltételezésünket erősíti, hogy a P2Y₁₂ receptornak fontos szerepe van a fájdalomban. A CFA által indukált gyulladáson alapuló fájdalommodellben a nocifenzív viselkedés mellett egy másik fizikai paramétert, a gyulladt végtag térfogatát is megmértük. A végtag térfogatára egyedül a klinikumban széles körben használt ticlopidine volt hatással. Az a jelenség, hogy az ödéma térfogatát nem befolyásolták azok a hatóanyagok, amik az allodyníát/hiperalgéziát jelentős mértékben csökkentették, arra utal, hogy a fájdalomcsillapító hatás a gyulladáson alapuló oedemát csökkentő hatástól függetlenül jelentkezett az általunk vizsgált tesztekben. Egy másik lehetséges magyarázat, hogy az általunk használt módszer, a plethysmometria nem kellően érzékeny és csak nagyobb mértékű ödéma csökkenésre mutat szignifikáns változást. A gyulladáson alapuló citokinek mennyiségi elemzése, különösen a proinflammatorikus IL-1 β szintek ugyanakkor úgy tűnik, hogy szorosan korrelálnak a fájdalommal.

A P2Y₁₂ receptor fájdalomban betöltött szerepét egy másik tanulmányunkban is vizsgáltuk, ahol CFA által indukált krónikus gyulladás során fellépő mechanikus hiperalgéziát, a gyulladt végtag térfogatának növekedését, neutrofil mieloperoxidáz aktivitást és a gyulladással kapcsolatos citokinszintek változását figyeltük meg vad típusú és P2Y₁₂ receptor génkiütött egereken. A PSB-0739 szignifikáns fájdalomcsillapító hatással bírt CFA által indukált krónikus gyulladás esetén is (Beko és munkatársai, 2017).

A farmakológiai vizsgálataink során kapott - a P2Y₁₂ receptor különböző típusú fájdalmakban betöltött szerepét igazoló - eredményeket megerősítő génkiütött egereken is elvégeztük mindhárom fájdalomtesztet. A hot plate tesztben magasabb hőmérsékleti értéket tűrtek a P2Y₁₂ -/- állatok a vad típusú társaikhoz viszonyítva. A CFA által kiváltott gyulladással járó fájdalommodellben mindkét csoportban (WT és KO) CFA hatására a fájdalomküszöb szignifikáns csökkenését tapasztaltuk, de a génkiütött egerek enyhébb fájdalmi reakciót mutattak, mint vad típusú társaik. A neuropátiás fájdalommodellben is hasonló különbségeket fedeztünk fel a csoportok között. A műtétet követő hetedik napon mindkét csoport a végtagelrántási küszöbérték szignifikáns csökkenését mutatta, de a vad típusú és génkiütött egerek PWT értéke közötti eltérés szignifikáns volt. A farmakológiai vizsgálatokhoz hasonlóan, génkiütött egereknél is megmértük a megfelelő gerincvelői szegmensek és a gyulladt talp citokin szintjeit a CFA indukált gyulladással járó fájdalommodellben. A gerincvelői proinflammatorikus IL-1 β szint CFA hatására bekövetkező változása csak a vad típusú állatokban volt tapasztalható, ez elmaradt a génkiütött egerekben. A gyulladt talp IL-1 β szintje genotípustól függetlenül megemelkedett CFA kezelés hatására (Beko és munkatársai, 2017). A génkiütött állatok akut neuropátiás fájdalmi reakcióban megmutatkozó különbségeiről a szakirodalom már beszámolt (Tozaki-Saitoh és munkatársai, 2008), de P2Y₁₂ receptor deficiens egerek gyulladással járó fájdalommodellben jelentkező eltérő nocifenzív reakciójáról eddig nem volt kísérletes adat.

A farmakológiai vizsgálatokkal egybevágó eredményeket tapasztaltunk génkiütött egerek esetében is, amely azt a hipotézisünket erősíti, hogy a P2Y₁₂ receptorgátlása *in vivo* fájdalomcsillapításhoz vezet. A gyulladással járó fájdalommodellben a fájdalmi reakcióval párhuzamosan változik a proinflammatorikus citokin szint farmakológiai blokáddal és génkiütés esetén egyaránt, ami azt mutatja, hogy a gerincvelői gyulladással

citokin szintek csökkenése – melyeknek fájdalomkeltő hatása jól ismert – minden bizonnyal a fájdalomcsillapító hatás közvetítő mechanizmusa.

6.2. P2Y₁₂ antagonisták 2-MeSADP által gátolt cAMP szintre gyakorolt hatásának vizsgálata

Transzfektált sejtvonalakon P2Y₁₂ receptor antagonisták farmakológiai vizsgálatait végeztük el. A kísérletek során meghatároztuk a különböző hatóanyagok IC₅₀, pA₂, pK_B és K_B értékeit humán rekombináns P2Y₁₂ receptoron. A kísérletekben suramin, reactive blue 2, PSB-0739, MRS2395 és cangrelor farmakológiai aktivitását vizsgáltuk, P2Y₁₂ receptoragonista 2-MeSADP ellenében, az isoproterenol (10nM), illetve forskolin (10 μM) által kiváltott cAMP szint emelkedésre. Isoproterenol esetén 1321N1 sejteket, forskolinnal történő indukció esetében pedig CHO sejtvonalat használtunk. Az általunk vizsgált antagonisták közül a PSB-0739 potens és szelektív vegyület. A suramin nem szelektív és alacsony affinitású purinreceptor blokkoló. A reactive blue 2 viszonylag potens, de kevésbé szelektív antagonistá. A cangrelor potens vegyület, mely P2Y_{12/13} szelektivitást mutat. A szakirodalmi eredmények között gyakran megjelenő MRS2395 nem valódi humán P2Y₁₂ receptorantagonista, natív patkány trombocitákon mért hatása közvetett kísérletes adatokon alapult (Xu és munkatársai, 2002). Kutatási eredményeink és korábban publikált *in vivo* fájdalomcsillapító hatása elképzelhető, hogy nem P2Y₁₂ receptormediált folyamatok eredménye (Ando és munkatársai, 2010; Horvath és munkatársai, 2014). A ticlopidine és clopidogrel pro drog-ok, ezért ebben a rendszerben nem voltak vizsgálhatóak. Az általunk vizsgált antagonisták közül az affinitás és szelektivitás alapján is a legkedvezőbb tulajdonságú antagonistákat választottuk ki a későbbi hatásmechanizmus vizsgálatokhoz, ezért a tanulmány második felét képező vizsgálatok során a PSB-0739- és a cangrelor hatását tanulmányoztuk. Az egyes antagonisták hatáserősségük alapján az alábbi sorrendbe tehetőek:

PSB0739> cangrelor> reactive blue 2> suramin

Az affinitáson túl meghatároztuk az egyes ligandok P2Y₁₂ receptorszelektivitását is:

PSB0739 >> cangrelor> reactive blue 2 > suramin

3. táblázat P2Y receptorantagonisták affinitási adatai humán P2Y receptor szubtypusokra

Vegyület	P2Y ₁	P2Y ₂	P2Y ₄	P2Y ₆	P2Y ₁₁	P2Y ₁₂	P2Y ₁₃	P2Y ₁₄
reactive blue 2	5.8 ^a	5.3 ^c	<4 ^{d,e}	6 ^{a,h}	<5 ^{d,f}	7.4 ^b	5.7 ^{c,g}	
suramin	5.5 ^a	4.5 ^c	<3.5 ^{d,i}	<4.5 ^{d,h}		5.7 ^b	5.6 ^{c,g}	
cangrelor						9.2 8.6 ^l 8.7	↓80% ^{g,j,k} (10 nM)	
MRS2395						nem kompetitív antagonista, emeli a cAMP szintet		
PSB-0739	- (>20 nM)	- (>20 nM)	- (>20 nM)	- (>20 nM)	- (>20 nM)	9.8 ^m 9.9	- (>20 nM)	- (>20 nM)

^apK_B^bpA₂^c-log(IC₅₀)^dhatástalan alacsonyabb koncentrációkban^e Communi et al. 1996 Eur J Pharmacol 317:383-389^f Communi et al. 1999 Br J Pharmacol 128 :1199-1206^g Marteau et al. 2003 Mol Pharmacol 64 :104-112^h Robaye et al. 1997 Eur J Pharmacol 329 :231-236ⁱ Charlton et al. 1996 Br J Pharmacol 119 :1301-1303^j Takasaki et al., 2001 Mol Pharmacol. 60, 432-9.^k Vasiljev et al. 2003 Neuropharmacology. 45:145-54.^l Hoffmann et al., 2008 Biochem Pharmacol 76, 1201-1213.^m Baqi et al., 2009 J Med Chem 52:3784-3793.

6.3. A P2Y₁₂ receptorgátlás okozta fájdalomcsillapító hatás háttérmechanizmusa

Célunk volt a P2Y₁₂ receptorgátlásával okozott antinociceptív hatások lehetséges háttérmechanizmusainak a felderítése is. Mivel a szakirodalom neuropátiás és akut fájdalommal már foglalkozott, elsősorban a gyulladásoz fájdalommodellben vizsgáltuk a lehetséges háttérmechanizmust. CFA indukált gyulladásoz kísérleteink során megvizsgáltuk és összehasonlítottuk a perifériás gyulladt szövet, valamint a központi idegrendszer megfelelő szegmenseinek a P2Y₁₂ receptor mRNS és gyulladásoz citokin tartalmát (**4. táblázat**). 48 órával a CFA injekciót követően az ödémás talpban P2Y₁₂R mRNS mennyiségének jelentős emelkedését, ezzel párhuzamosan az IL-1 β overexpresszióját tapasztaltuk. A lumbális L4-6 gerincvelői szegmensekben citokin- illetve P2Y₁₂ receptor mRNS szintekben bekövetkező jelentős változásokat csak később, mintegy 96 órával az intraplantáris kezelést követően tapasztaltuk, ami azt sugallja, hogy a P2Y₁₂ receptor mediált gyulladás időfüggő, késleltetett lefutású a központi idegrendszerben (**4. táblázat**). Az általunk kiválasztott szelektív antagonisták, a cangrelor és a PSB-0739 csökkentette a gerincvelői proinflammatórikus IL-1 β szinteket. Hasonló eredményeket tapasztaltunk a P2Y₁₂ receptor génkiütött állatokon végzett vizsgálatok során is. Az akut fázis válasz elemeként ismert IL-1 β fontos szerepet játszik a központi szenzitizáció folyamataiban, amelynek során a gerincvelő lamina II-ben spontán excitátoz posztszinaptikus áramok (sEPSC) gyarapodása és ezzel párhuzamosan a gátló posztszinaptikus áramok (sIPSC) csökkenése figyelhető meg. E hatások mellett ismert még az IL-1 β CREB (cAMP response element-binding protein) foszforilációra és a nociceptív neuronok plaszticitására gyakorolt hatása is (Kawasaki és munkatársai, 2008). Az általunk tesztelt antagonisták hatásának magyarázata lehet a gerincvelői IL-1 β produkciót csökkentő hatás, ami azonban nem tekinthető kizárólagosnak, mert az antagonista kezelés *in vivo* fájdalomcsillapító hatásoz volt már az intraplantáris CFA injekciót követő 48. órában, amikor a gerincvelőben még nem tapasztalható IL-1 β emelkedés.

A PSB-0739 szintén hatással volt az ödémás talp citokin termelésére (**4. táblázat**). A CFA hatására emelkedést mutató gyulladt szöveti IL-1 β -, TNF- α -, IL-6- és IL-10 szinteket intrathecalisan adagolt PSB-0739 jelentős mértékben csökkentette. Cangrelor ilyen jellegű hatását csak a TNF- α - és az IL-10 esetében tapasztaltuk. A perifériás citokinek és a fájdalomérzet kapcsolata jól dokumentált (Ren, Dubner, 2010; Scholz,

Woolf, 2007), ezért okkal feltételezhető, hogy perifériás citokinek (IL-1 β , TNF- α és az IL-6) által is közvetített a PSB-0739 hatása.

4. táblázat P2Y₁₂ farmakológiai és genetikai blokádjának a hatása a gyulladt végtag és a gerincvelő citokinszintjeire

	Gyulladt végtag		Gerincvelő	
	Cangrelor	PSB-0739	Cangrelor	PSB-0739
IL-1 β	-	↓	↓	↓
TNF α	↓	↓	-	-
IL-10	↓	↓	-	-
IL-6	-	↓	-	-

Intraplantáris CFA kezelés hatása

	Gyulladt végtag		Gerincvelő	
	P2Y ₁₂ +/+	P2Y ₁₂ -/-	P2Y ₁₂ +/+	P2Y ₁₂ -/-
IL-1 β	↑	↑	↑	-

A P2Y₁₂ receptor gyulladáshoz mért emelkedett expressziója, illetve az ezzel párhuzamosan mért citokin szintek változása is ezt a feltételezést támasztja alá. A P2Y₁₂ receptor egyéb P2 receptor altípusokkal együtt a perifériás szenzoros terminálisok mellett keratinocitákon és dendritikus sejteken is expresszálódik, amik szintén fontos mediátorai lehetnek a citokin felszabadulásnak mint lokális gyulladáshoz folyamatnak (Malin, Molliver, 2010).

A centrális adagolású PSB-0739 perifériás citokin szintet befolyásoló hatása még további magyarázatokra és bizonyításra szorul. Nem zárható ki teljes mértékben az a lehetőség, hogy a központi adagolású PSB-0739 valamilyen módon eléri a perifériát.

Szakirodalmi adatok 3-5 nappal a CFA adását követően írják le a vér-agy gát fokozott permeabilitását, illetve az intrathecalis adagolásnál is elképzelhető, hogy bizonyos mennyiségű hatóanyag a perifériára illetve a hátsó gyöki ganglionba kerül (Raghavendra és munkatársai, 2004). Ennek ellenére ez a hatás kevésbé valószínű, mivel azonos dózisú intraperitoneális adagolású PSB-0739 hatástalan volt az általunk vizsgált fájdalommodellekben, ami a hatóanyag primér centrális hatására utal.

A potens és szelektív antagonisták lehetséges hatásmódját farmakológiai és kísérletes műtéti beavatkozással derítettük fel. Először a P2Y₁₂ receptort expresszáló, gerincvelőből kilépő szimpatikus posztganglionáris rostok farmakológiai blokádjának a hatását vizsgáltuk meg Lechner és munkatársai által közölt tanulmány alapján (Lechner és munkatársai, 2004; Sandkuhler, 2009). A szisztémás 6-OHDA kezelés nem befolyásolta a PSB-0739 gyulladásos fájdalommodellben korábban tapasztalt fájdalomcsillapító hatását, ami más efferens mechanizmust sejtet.

Ezzel ellentétben a szisztémásan adagolt $\alpha 7$ nikotinos acetilkolin receptorantagonista MLA felfüggesztette a PSB-0739 fájdalomcsillapító hatását. Ezt megerősítő subdiaphragmaticus vagotómiát követően végzett fájdalomkísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a vagotómia kivédte a potens és szelektív P2Y₁₂ receptorantagonista PSB-0739 antinociceptív hatását, tehát úgy tűnik, hogy a centrális P2Y₁₂ receptor blokkolás fájdalomcsillapító efferens mechanizmusát paraszimpatikus, kolinerg rostok valósítják meg.

Szisztémás anti kolinerg kezelés nemcsak a PSB-0739 anti nocifenzív hatását függesztette fel, de ezzel párhuzamosan a PSB-0739 gyulladásos citokineket befolyásoló hatását is. Az $\alpha 7$ nikotinos acetilkolin receptorantagonista MLA központi idegrendszeri penetrációja elhanyagolható mértékű ezért a kísérletes adataink arra engednek következtetni, hogy a bolygóideg közvetíti a centrálisan adagolt PSB-0739 perifériás hatását (Medhurst és munkatársai, 2008; Turek és munkatársai, 1995) az $\alpha 7nACh$ receptoron keresztül. Ez egybevág a bolygóideg ismert, citokin szintet befolyásoló hatásával és a $\alpha 7nACh$ perifériás immunsejteken történő expressziójával (Borovikova és munkatársai, 2000; Pavlov és munkatársai, 2003). Az $\alpha 7nACh$ receptor aktiváció hatására bekövetkező gyulladásos és neuropátiás fájdalom csökkenése jól ismert folyamat (Loram és munkatársai, 2012; Medhurst és munkatársai, 2008).

Feltételezhető, hogy a periférián a gyulladás helyére toborzott immunsejteken levő nikotinos acetilkolin receptor endogén aktivációja okozza a fájdalomcsillapító hatást. Emellett a gyulladásos válasz egyéb korai mediátorai, például kemokinek, vagy egyéb supraspinális mechanizmusok is szerepet játszhatnak a centrális P2Y₁₂ receptoraktiváció perifériás citokin válaszra gyakorolt hatásában (Kiguchi és munkatársai, 2012; Ransohoff, 2009). A szakirodalomban több olyan forrás is van, ami P2Y₁₂ receptor aktivációjára bekövetkező mikroglia kemotaxisról illetve neuron-mikroglia interakcióról számol be (Honda és munkatársai, 2001; Maeda és munkatársai, 2010).

6.4. Mellékhatás vizsgálatok

Bár a gyakorló orvos számára a fájdalomcsillapítók egész arzenálja áll rendelkezésre, a klinikai gyakorlatban a neuropátiás és gyulladásos fájdalom a mai napig kihívást jelent, mert a forgalomban lévő szerek erős fájdalom esetén gyakran hatástalanok, vagy a terápiás dózistartományban nem kívánt mellékhatásokkal bírnak.

A Rotarod teszt során felmértük a P2Y₁₂ receptorantagonista PSB-0739 illetve P2Y_{12/13} receptorantagonista cangrelor motoros koordinációra gyakorolt hatását. A teszt lehetővé teszi, hogy koordinációt, motoros tanulást, intoxikációt, szedációt és erősséget mérjünk egereken illetve patkányokon. Az általunk tesztelt szelektív P2Y₁₂ receptorantagonista PSB-0739 esetében nem tapasztaltunk akut mozgáskoordinációra gyakorolt hatást.

Másrésről számolni kell a P2Y₁₂ receptor antagonisták trombocita aggregációt gátló hatásával a fájdalomcsillapító dózistartományban, hiszen a P2Y₁₂ receptor a vérlemezke ADP receptora. Az intraperitoneálisan adagolt cangrelor *ex vivo* aggregáció gátlását tapasztaltuk, ezzel szemben az intrathecalisan adagolt PSB-0739 esetében éppen ellenkező hatást tapasztaltunk. Feltételezhető, hogy a különböző P2Y₁₂ receptorantagonisták erősebb fájdalomcsillapító hatással bírnának, ha képesek lennének átjutni a vér-agy gáton.

7. Következtetések

Eredményeink összefoglalása és az azokból adódó következtetések a kérdésvetésekre reflektálva az alábbiak:

7.1. P2Y₁₂ receptorgátlás vizsgálata fájdalom különböző állatmodelljeiben.

Ezekben a vizsgálatokban hat vegyület hatását vizsgáltuk meg összesen három fájdalommodellben. Az inkrementáló hot plate tesztben összesen négy antagonistát volt hatékony, a neuropátiás fájdalommodell esetén öt, a CFA által indukált gyulladós fájdalommodellben pedig az összes általunk vizsgált antagonistát hatásosnak bizonyult. A potens és szelektív P2Y₁₂ receptorantagonista PSB-0739, illetve a P2Y_{12/13} receptoron ható cangrelor voltak a leghatékonyabbak az összes fájdalomtesztben. A PSB-0739 dózisfüggetlen hatású volt a hot plate tesztben, míg a többi kéttípusú fájdalom esetén dózisfüggést tapasztaltunk. Érdekes módon, a végtag térfogatát mérő tesztben egyedül a ticlopidine-nek volt szignifikáns hatása.

A P2Y₁₂ receptor fájdalomban betöltött szerepe már ismert volt, ám elsőként számoltunk be a P2Y₁₂ receptor gyulladós fájdalomban betöltött szerepéről.

Génkiütött egereken fájdalmi reakcióit is megvizsgáltuk, azok megfelelő kontrolljaival (vad típusú alomtársaik) együtt. Az akut fájdalomtesztben magasabb hőmérsékleten mutatták a fájdalmi reakciót a KO állatok. Neuropátiás fájdalom esetén az ülőideg részleges lekötését követően a végtagelrántási küszöbértékek lecsökkentek mindkét genotípusnál, de a fájdalmi reakció egy enyhébb formája jelent meg KO állatok esetén. Ehhez hasonló eredményt kaptunk a gyulladós fájdalommodellben is: génkiütött állatok enyhébb fokú fájdalomküszöb csökkenést mutattak, mint vad típusú társaik.

Az interleukin-1 béta értékek a fájdalmi reakcióval párhuzamosan változnak gyulladós fájdalom esetén. Intraplantáris CFA kezelést követően az IL-1 β szint megemelkedik, P2Y₁₂ blokádjának hatására a citokin szintje csökken. Génkiütött egerekben a gerincvelői IL-1 béta szint változatlan maradt CFA kezelést követően.

A P2Y₁₂ receptorgátlása csökkentette a fájdalmat az általunk használt állatmodellekben. Az *in vivo* adatok szorosan korrelálnak az *in vitro* adatokkal.

7.2. P2Y₁₂ receptor antagonisták farmakológiai aktivitásának felmérése

A transzfektált sejtvonalakon történő vizsgálatok során P2Y₁₂ antagonisták 2-MeSADP által gátolt cAMP szintre gyakorolt hatását mértük és meghatároztuk a K_b, pA₂ és pK_B értékeket.

A PSB-0739 potens és szelektív P2Y₁₂ receptorantagonista. A cangrelor P2Y_{12/13} receptor szelektivitást mutat, affinitása a PSB-0739-hez hasonló.

A kutatásban széles körben használt MRS2395-ről kiderült, hogy nem valódi humán P2Y₁₂ receptorantagonista.

A prodrug vegyületek (clopidogrel és ticlopidine) ebben a tesztben nem vizsgálhatóak.

A vizsgált antagonisták közül a PSB-0739 potens és szelektív antagonistája a humán P2Y₁₂ receptornak. A viselkedésfarmakológiai kísérletek szerint a PSB-0739 volt a leghatásosabb az általunk vizsgált három fájdalommodellben, amiből az következik, hogy a P2Y₁₂ receptor szelektív gátlása fájdalomcsillapításhoz vezet. A többi antagonistá eltérő mértékben volt hatékony a különböző fájdalomtesztekben. A nem szelektív vegyületek enyhébb hatásukat lehet, hogy éppen más receptoron történő gátlásuknak köszönhetik. Az MRS-2395 fájdalomcsillapító hatása úgy tűnik, hogy teljesen független a P2Y₁₂ receptortól.

7.3. A P2Y₁₂ receptor gátlással okozott hatások háttérmechanizmusainak felderítése.

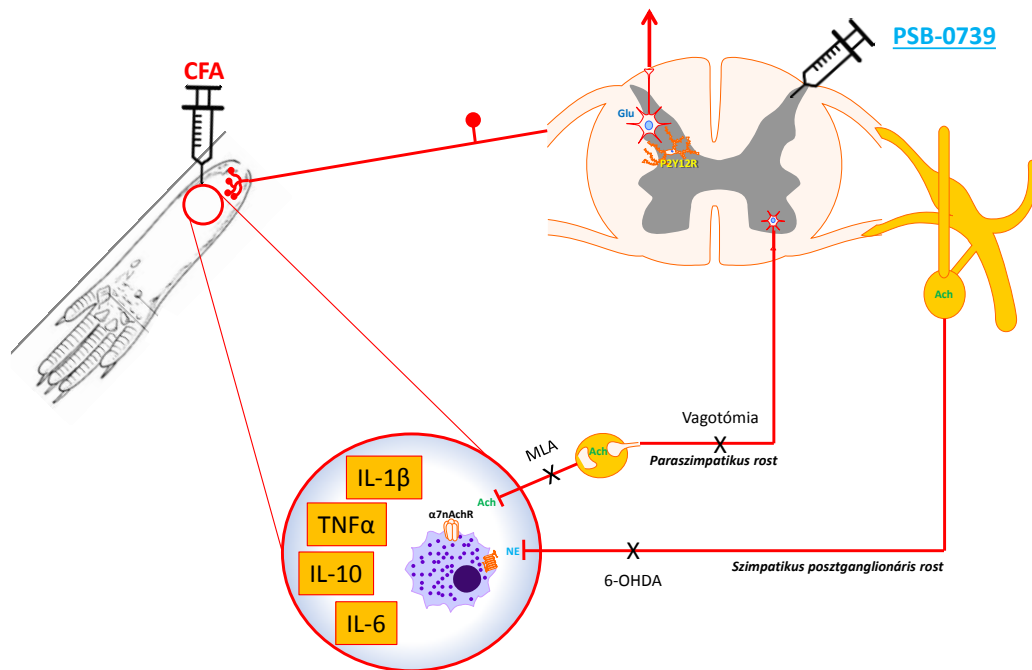
A vizsgálataink első részében kapott hatások lehetséges mechanizmusait molekuláris biológiai technikák alkalmazásával derítettük fel.

7.3.1: Kvantitatív Real-Time PCR-rel vizsgáltuk a P2Y₁₂ receptor mRNS szint változását, ELISA és FACS módszerrel az IL-1 béta expressziót, luminex-platform segítségével multiplex citokin mérést végeztünk el perifériás szövetben és a központi idegrendszerben egyaránt.

7.3.2: Farmakológiai blokádnak és műtéti denervációt követően a citokin szintek változását vizsgáltuk, hogy a P2Y₁₂ receptor gyulladási folyamatokban betöltött szerepét tisztázzuk.

Időfüggő, késleltetett lefutású P2Y₁₂ mRNS szintű overexpressziót tapasztaltunk a gyulladt talpban és a gerincvelő L4-6 szakaszon CFA kezelést követően.

A potens és szelektív antagonistának PSB-0739 intrathecalis adagolással csökkentette a perifériás és centrális emelkedett gyulladási citokin szinteket. A szimpatikus posztganglionáris rostok farmakológiai blokádnak nem függesztette fel a PSB-0739 hatását, ezzel szemben a szisztémásan adagolt nAChR α 7 antagonistának MLA felfüggesztette a PSB-0739 fájdalomcsillapító-, valamint a gyulladási citokinek szintjére gyakorolt hatását. A subdiaphragmaticus vagotómia is kivédte a PSB-0739 fájdalomcsillapító hatását. Eredményeinket összegezve arra következtethetünk, hogy a potens és szelektív antagonistának PSB-0739 gyulladási fájdalomra gyakorolt hatása kolinerg efferenciációjú.



42. ábra A gyulladásos fájdalom modellben alkalmazott P2Y₁₂ receptorantagonista PSB-0739 feltételezett hatásmechanizmusa: intraplantáris CFA (Complete's Freund Adjuvant) injekciót követően a talpban gyulladásos folyamatok indulnak meg. A primér afferens rost a gerincvelő hátsó szarvban található projekciós illetve interneuronokhoz kapcsolódik továbbítva az ingerületet felsőbb agyi struktúrák felé. A gerincvelőbe injektált PSB-0739 központi fájdalomcsillapító hatását közvetlenül neuronon és aktivált mikroglían fejtí ki, indirekt módon azonban képes a perifériás gyulladásos citokinszintet is befolyásolni. Szisztémás 6-hidroxidopamin kezelés nem befolyásolta a PSB-0739 hatását. Szubdiafragmatikus vagotómia, illetve szisztémás antikolinerg kezelés (MLA, metil-akonitin) azonban felfüggesztette a P2Y₁₂ receptor szelektív antagonista PSB-0739 hatását, ezért vélhetőleg a PSB efferens hatása paraszimpatikus, kolinerg rostok közvetítésével történik.

7.4. Az általunk használt P2Y₁₂ receptor antagonisták esetleges mellékhatásainak vizsgálata.

Kísérleteinkben megvizsgáltuk az általunk használt antagonisták mozgás koordinációra, valamint trombocita aggregációra gyakorolt hatását. A rotarod teszt eredményei azt mutatják, hogy az ip. adagolt Cangrelor, illetve az it. adagolt PSB-0739 nem volt hatással az állatok mozgáskoordinációjára. Az *ex vivo* trombocita aggregációs vizsgálat eredménye szerint a cangrelor gátolja a trombocita aggregációt, ezzel szemben a PSB-0739 ellenkező hatásúnak bizonyult. Az eredmények alapján azt feltételezzük, hogy a különböző antagonisták a vér-agy gáton átjutva erősebb hatásúak is lehetnek.

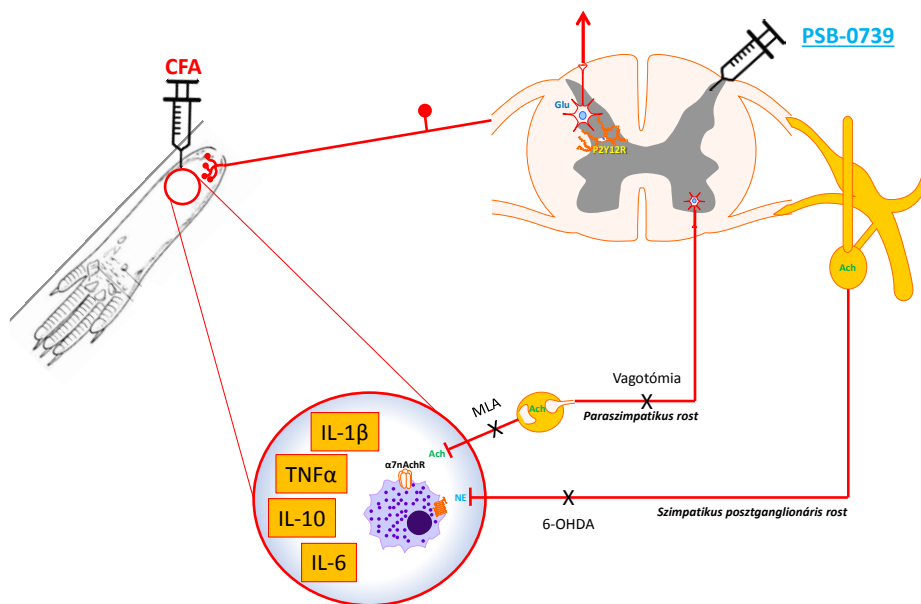
Megállapítottuk, hogy a PSB-0739 valódi humán P2Y₁₂ receptorantagonista, amely fájdalom különböző állatmodelleiben hatékony antinociceptív vegyület. P2Y₁₂ receptor génkiütött egerek a fájdalmat jobban tolerálták vad típusú alomtársaikhoz képest. A P2Y₁₂ antagonistá befolyásolta a perifériás és centrális gyulladási citokin szinteket, valamint ezzel párhuzamosan a nocifenzív viselkedés megjelenését egyaránt. A P2Y₁₂ receptorantagonista hatását felfüggesztette a vagotómia és a szisztémás antikolinerg terápia. A P2Y₁₂ receptor tehát egy ígéretes terápiás célpont lehet gyulladási fájdalom esetén, mely hatás efferens kolinerg rostok közreműködésével valósul meg.

A thienopyridinek közül a ticlopidine (Ticlid, Aclotine, Aplatic, Ipaton), a clopidogrel (Atrombin, ClopidEP, Clopidogrel, Clopidogrel-Q, Egitromb, Kardogrel, Kerberan, Lofradyl, Lopigalel, Plagrel, Plavix) a prasugrel (Efient), valamint a cangrelor (Kengreal) jelenleg is klinikai forgalomban levő és széles körben alkalmazott antiaggregáns szerek, melyeknek mellékhatásairól, dózis-hatás összefüggéseiről, biztonságosságukról humán adat is bőven rendelkezésre áll. Kísérleteink során egy új indikációban, különböző fájdalommodellekben vizsgáltuk meg a P2Y₁₂ receptoron ható szereket. Kísérleteink eredményeit összegezve úgy tűnik, hogy a P2Y₁₂ receptor antagonisták megfelelő hatásúak, és mivel az általunk elvégzett mellékhatásvizsgálatok mellett klinikai információ is rendelkezésre áll, biztonságosan alkalmazhatók a gyógyászatban, ezért ideális terápiás lehetőségként tekintünk rájuk a fájdalom medikációban. Fontos azonban megjegyezni azt is, hogy az antiaggregáns terápia targetjeként szolgáló vérlemezkéken történő hatásról vannak humán adatok, a fájdalomcsillapításra pedig elsősorban mikroglián expresszálandó receptorokat

targetálunk. Mindemellett az alapkutatás és a gyógyszerfejlesztés közös alapvető kérdésköréként ismert transzlációs kihívások szempontjából az általunk vizsgált P2Y₁₂ receptor ígéretes célpontnak tűnik.

8. Összefoglalás

A purin nukleotidok fontos extracelluláris szabályozómolekulák, melyek jelentős hatással bírnak különböző környéki- és központi idegrendszeri folyamatokra is, ezért szerepüket tisztázandó intenzív kutatómunka zajlik. A P2Y₁₂ receptor fájdalomban betöltött szerepéről az utóbbi időben jelentek meg kísérletes adatok. Eredményeink szerint a P2Y₁₂ receptor farmakológiai gátlása képes enyhíteni a gyulladásos és neuropátiás fájdalmat, valamint hatással van az akut termális fájdalomra is. A P2Y₁₂ receptor potens és szelektív antagonistája PSB-0739 volt a leghatékonyabb az általunk vizsgált antagonisták közül. A farmakológiai blokádot fájdalomcsillapító hatását megerősítették géniüti egereken végzett kísérleteink. A gerincvelői/központi P2Y₁₂ receptorgátlás szignifikánsan csökkentette a gyulladásos citokinek mennyiségét a gerincvelőben, valamint a gyulladt talpban, az általunk alkalmazott CFA indukált gyulladásos fájdalommodellben. A hatásmechanizmus vizsgálat szerint a P2Y₁₂ receptor blokádot fájdalomcsillapító- és citokinszintet befolyásoló hatását α 7-nikotinos acetilkolin receptor közvetítésével fejtette ki (42. ábra).



42. ábra A gyulladásos fájdalom modellben alkalmazott P2Y₁₂ receptorantagonista PSB-0739 feltételezett hatásmechanizmusa: A gerincvelőbe injektált PSB-0739 központi fájdalomcsillapító hatását szubdiafragmatikus vagotómia, illetve szisztémás antikolinerg kezelés felfüggesztette ezért vélhetőleg a PSB efferens hatása paraszimpatikus, kolinerg rostok közvetítésével történik.

9. Summary

Purine nucleotides are key extracellular modulators playing role in processes of peripheral and central nervous system, respectively. Intensive research is going on in order to clarify the roles of these molecules. P2Y₁₂ receptors contribution has been implicated in pathological pain recently. Based on our results pharmacological blockade of P2Y₁₂ receptors attenuated not just neuropathic pain but inflammatory pain and acute thermal nociception also. Based on our results, pharmacological inhibition of P2Y₁₂ receptor can alleviate inflammatory and neuropathic pain and can affect acute thermal nociception respectively. Potent and selective P2Y₁₂ antagonist PSB-0739 was found to be the most effective among the compounds we had tested. The analgesic action of pharmacological blockade was confirmed by experiments on mice lacking P2Y₁₂ receptor. Central inhibition of P2Y₁₂ receptor significantly decreased the amount of inflammatory cytokines in the spinal cord and in the inflamed hindpaw, respectively in the CFA induced inflammatory pain model. P2Y₁₂ receptor blockade had its action on nocifensive behaviour and on cytokine production via α 7-nicotinic acetylcholine receptor (Figure 42).

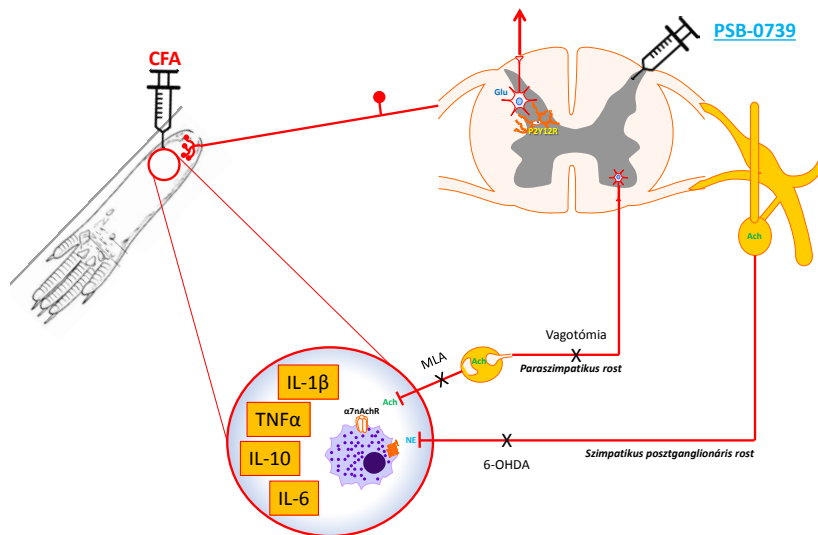


Figure 42. Mechanism of action of P2Y₁₂ receptor antagonist PSB-0739 in the inflammatory pain model: Centrally injected PSB-0739 analgesic action was inhibited by subdiaphragmatic vagotomy and systemic anticholinergic therapy therefore we assume that the efferent mechanism of PSB is mediated by parasympathetic, cholinergic fibers.

10. Irodalomjegyzék

- Abbracchio, M P, Burnstock, G, Boeynaems, J M, Barnard, E A, Boyer, J L, Kennedy, C, Knight, G E, Fumagalli, M, Gachet, C, Jacobson, K A és Weisman, G A. (2006). International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacological Reviews*, 58(3), 281-341. doi:10.1124/pr.58.3.3
- Almasi, R, Petho, G, Bolcskei, K és Szolcsanyi, J. (2003). Effect of resiniferatoxin on the noxious heat threshold temperature in the rat: a novel heat allodynia model sensitive to analgesics. *Br J Pharmacol*, 139(1), 49-58.
- Amadio, S, Tramini, G, Martorana, A, Viscomi, M T, Sancesario, G, Bernardi, G és Volonte, C. (2006). Oligodendrocytes express P2Y12 metabotropic receptor in adult rat brain. *Neuroscience*, 141(3), 1171-1180. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.05.058
- Ando, R D, Mehesz, B, Gyires, K, Illes, P és Sperlagh, B. (2010). A comparative analysis of the activity of ligands acting at P2X and P2Y receptor subtypes in models of neuropathic, acute and inflammatory pain. *Br J Pharmacol*, 159(5), 1106-1117. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00596.x
- Andrews, P L R, Rothwell, N J és Stock, M J. (1985). Effects of Subdiaphragmatic Vagotomy on Energy-Balance and Thermogenesis in the Rat. *Journal of Physiology-London*, 362(May), 1-12.
- Arunlakshana, O és Schild, H O. (1997). Some quantitative uses of drug antagonists. 1958. *Br J Pharmacol*, 120(4 Suppl), 151-161; discussion 148-150.
- Bardoni, R, Goldstein, P A, Lee, C J, Gu, J G és MacDermott, A B. (1997). ATP P2X receptors mediate fast synaptic transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Neurosci*, 17(14), 5297-5304.
- Beamer, E, Goloncser, F, Horvath, G, Beko, K, Otrókocsi, L, Kovanyi, B és Sperlagh, B. (2016). Purinergic mechanisms in neuroinflammation: An update from molecules to behavior. *Neuropharmacology*, 104, 94-104. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.09.019
- Beko, K, Kovanyi, B, Goloncser, F, Horvath, G, Denes, A, Kornyei, Z, Botz, B, Helyes, Z, Muller, C E és Sperlagh, B. (2017). Contribution of platelet P2Y12 receptors to chronic Complete Freund's adjuvant-induced inflammatory pain. *J Thromb Haemost*. doi:10.1111/jth.13684
- Bodor, E T, Waldo, G L, Hooks, S B, Corbitt, J, Boyer, J L és Harden, T K. (2003). Purification and functional reconstitution of the human P2Y12 receptor. *Mol Pharmacol*, 64(5), 1210-1216. doi:10.1124/mol.64.5.1210
- Born, G V R. (1977). Citation Classic - Aggregation of Blood-Platelets by Adenosine-Diphosphate and Its Reversal. *Current Contents*(37), 8-8.
- Borovikova, L V, Ivanova, S, Nardi, D, Zhang, M, Yang, H, Ombrellino, M és Tracey, K J. (2000). Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation. *Auton Neurosci*, 85(1-3), 141-147. doi:10.1016/s1566-0702(00)00233-2
- Burnstock, G. (1996). Development and perspectives of the purinoceptor concept. *J Auton Pharmacol*, 16(6), 295-302.
- Burnstock, G, Krugel, U, Abbracchio, M P és Illes, P. (2011). Purinergic signalling: From normal behaviour to pathological brain function. *Progress in Neurobiology*, 95(2), 229-274. doi:DOI 10.1016/j.pneurobio.2011.08.006
- Cattaneo, M. (2011). The platelet P2Y(1)(2) receptor for adenosine diphosphate: congenital and drug-induced defects. *Blood*, 117(7), 2102-2112. doi:10.1182/blood-2010-08-263111

- Chang, K, Hanaoka, K, Kumada, M és Takuwa, Y. (1995). Molecular cloning and functional analysis of a novel P2 nucleotide receptor. *J Biol Chem*, 270(44), 26152-26158.
- Chapman, K Z, Dale, V Q, Denes, A, Bennett, G, Rothwell, N J, Allan, S M és McColl, B W. (2009). A rapid and transient peripheral inflammatory response precedes brain inflammation after experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29(11), 1764-1768. doi:10.1038/jcbfm.2009.113
- Charlton, S J, Brown, C A, Weisman, G A, Turner, J T, Erb, L és Boarder, M R. (1996). Cloned and transfected P2Y4 receptors: characterization of a suramin and PPADS-insensitive response to UTP. *Br J Pharmacol*, 119(7), 1301-1303.
- Communi, D, Gonzalez, N S, Detheux, M, Brezillon, S, Lannoy, V, Parmentier, M és Boeynaems, J M. (2001). Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *J Biol Chem*, 276(44), 41479-41485. doi:10.1074/jbc.M105912200
- Communi, D, Motte, S, Boeynaems, J M és Pirotton, S. (1996). Pharmacological characterization of the human P2Y4 receptor. *Eur J Pharmacol*, 317(2-3), 383-389.
- Communi, D, Robaye, B és Boeynaems, J M. (1999). Pharmacological characterization of the human P2Y11 receptor. *Br J Pharmacol*, 128(6), 1199-1206. doi:10.1038/sj.bjp.0702909
- Csölle, C. (2013). *P2 receptorok részvétele a központi idegrendszerfiziológiás és kóros működésében: a neurotranszmitter felszabadulástól a teljes genom microarray analízisig.* Retrieved from http://phd.semmelweis.hu/mwp/phd_live/vedes/export/csollececilia.d.pdf
- Denes, A, Humphreys, N, Lane, T E, Grecis, R és Rothwell, N. (2010). Chronic systemic infection exacerbates ischemic brain damage via a CCL5 (regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted)-mediated proinflammatory response in mice. *J Neurosci*, 30(30), 10086-10095. doi:10.1523/JNEUROSCI.1227-10.2010
- Dolphin, A C. (2003). Beta subunits of voltage-gated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr*, 35(6), 599-620.
- Dunn, P M, Zhong, Y és Burnstock, G. (2001). P2X receptors in peripheral neurons. *Progress in Neurobiology*, 65(2), 107-134.
- Elenkov, I J, Wilder, R L, Chrousos, G P és Vizi, E S. (2000). The sympathetic nerve - An integrative interface between two supersystems: The brain and the immune system. *Pharmacological Reviews*, 52(4), 595-638.
- Franke, H, Krugel, U, Grosche, J, Heine, C, Hartig, W, Allgaier, C és Illes, P. (2004). P2Y receptor expression on astrocytes in the nucleus accumbens of rats. *Neuroscience*, 127(2), 431-441. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.05.003
- Fumagalli, M, Brambilla, R, D'Ambrosi, N, Volonte, C, Matteoli, M, Verderio, C és Abbraccio, M P. (2003). Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: Role of P2X and P2Y receptors. *Glia*, 43(3), 218-203. doi:10.1002/glia.10248
- Gachet, C. (2012). P2Y(12) receptors in platelets and other hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Purinergic Signal*, 8(3), 609-619. doi:10.1007/s11302-012-9303-x
- Gerevich, Z, Borvendeg, S J, Schroder, W, Franke, H, Wirkner, K, Norenberg, W, Furst, S, Gillen, C és Illes, P. (2004). Inhibition of N-type voltage-activated calcium channels in rat dorsal root ganglion neurons by P2Y receptors is a possible mechanism of ADP-induced analgesia. *Journal of Neuroscience*, 24(4), 797-807. doi:10.1523/Jneurosci.4019-03.2004
- Heinrich, A. (2013). *Purinerg jelátvitel vizsgálata a központi idegrendszerben magas felbontású vizsgálati módszerekkel* Semmelweis University. Retrieved from http://phd.semmelweis.hu/mwp/phd_live/vedes/export/heinrichattila.d.pdf
- Hoffmann, K, Baqi, Y, Morena, M S, Glanzel, M, Muller, C E és von Kugelgen, I. (2009). Interaction of New, Very Potent Non-Nucleotide Antagonists with Arg256 of the

- Human Platelet P2Y₁₂ Receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 331(2), 648-655. doi:DOI 10.1124/jpet.109.156687
- Hoffmann, K, Sixel, U, Di Pasquale, F és von Kugelgen, I. (2008). Involvement of basic amino acid residues in transmembrane regions 6 and 7 in agonist and antagonist recognition of the human platelet P2Y₁₂-receptor. *Biochem Pharmacol*, 76(10), 1201-1213. doi:DOI 10.1016/j.bcp.2008.08.029
- Hollopeter, G, Jantzen, H M, Vincent, D, Li, G, England, L, Ramakrishnan, V, Yang, R B, Nurden, P, Nurden, A, Julius, D és Conley, P B. (2001). Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature*, 409(6817), 202-207.
- Honda, S, Sasaki, Y, Ohsawa, K, Imai, Y, Nakamura, Y, Inoue, K és Kohsaka, S. (2001). Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through G(i/o)-coupled P2Y receptors. *Journal of Neuroscience*, 21(6), 1975-1982.
- Horvath, G, Goloncser, F, Csolle, C, Kiraly, K, Ando, R D, Baranyi, M, Kovanyi, B, Mate, Z, Hoffmann, K, Algaier, I, Baqi, Y, Muller, C E, Von Kugelgen, I és Sperlagh, B. (2014). Central P2Y₁₂ receptor blockade alleviates inflammatory and neuropathic pain and cytokine production in rodents. *Neurobiol Dis*, 70, 162-178. doi:10.1016/j.nbd.2014.06.011
- Hussl, S és Boehm, S. (2006). Functions of neuronal P2Y receptors. *Pflugers Arch*, 452(5), 538-551. doi:10.1007/s00424-006-0063-8
- Illes, P, Nieber, K és Norenberg, W. (1996). Electrophysiological effects of ATP on brain neurones. *J Auton Pharmacol*, 16(6), 407-411.
- Kawasaki, Y, Zhang, L, Cheng, J K és Ji, R R. (2008). Cytokine mechanisms of central sensitization: Distinct and overlapping role of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-beta in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *Journal of Neuroscience*, 28(20), 5189-5194. doi:Doi 10.1523/Jneurosci.3338-07.2008
- Kiguchi, N, Kobayashi, Y és Kishioka, S. (2012). Chemokines and cytokines in neuroinflammation leading to neuropathic pain. *Current Opinion in Pharmacology*, 12(1), 55-61. doi:DOI 10.1016/j.coph.2011.10.007
- Kobayashi, K, Fukuoka, T, Yamanaka, H, Dai, Y, Obata, K, Tokunaga, A és Noguchi, K. (2006). Neurons and glial cells differentially express P2Y receptor mRNAs in the rat dorsal root ganglion and spinal cord. *J Comp Neurol*, 498(4), 443-454. doi:10.1002/cne.21066
- Kobayashi, K, Yamanaka, H, Fukuoka, T, Dai, Y, Obata, K és Noguchi, K. (2008). P2Y₁₂ receptor upregulation in activated microglia is a gateway of p38 signaling and neuropathic pain. *J Neurosci*, 28(11), 2892-2902. doi:10.1523/JNEUROSCI.5589-07.2008
- Lechner, S G, Dorostkar, M M, Mayer, M, Edelbauer, H, Pankevych, H és Boehm, S. (2004). Autoinhibition of transmitter release from PC12 cells and sympathetic neurons through a P2Y receptor-mediated inhibition of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Eur J Neurosci*, 20(11), 2917-2928. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03760.x
- Libert, C. (2003). Inflammation: A nervous connection. *Nature*, 421(6921), 328-329. doi:10.1038/421328a
- Loram, L C, Taylor, F R, Strand, K A, Maier, S F, Speake, J D, Jordan, K G, James, J W, Wene, S P, Pritchard, R C, Green, H, Van Dyke, K, Mazarov, A, Letchworth, S R és Watkins, L R. (2012). Systemic administration of an alpha-7 nicotinic acetylcholine agonist reverses neuropathic pain in male Sprague Dawley rats. *J Pain*, 13(12), 1162-1171. doi:10.1016/j.jpain.2012.08.009
- Lorton, D, Lubahn, C, Klein, N, Schaller, J és Bellinger, D L. (1999). Dual role for noradrenergic innervation of lymphoid tissue and arthritic joints in adjuvant-induced arthritis. *Brain Behav Immun*, 13(4), 315-334. doi:10.1006/brbi.1999.0564

- Maeda, M, Tsuda, M, Tozaki-Saitoh, H, Inoue, K és Kiyama, H. (2010). Nerve injury-activated microglia engulf myelinated axons in a P2Y₁₂ signaling-dependent manner in the dorsal horn. *Glia*, 58(15), 1838-1846. doi:10.1002/glia.21053
- Malin, S A és Molliver, D C. (2010). Gi- and Gq-coupled ADP (P2Y) receptors act in opposition to modulate nociceptive signaling and inflammatory pain behavior. *Mol Pain*, 6, 21. doi:10.1186/1744-8069-6-21
- Marteau, F, Le Poul, E, Communi, D, Communi, D, Labouret, C, Savi, P, Boeynaems, J M és Gonzalez, N S. (2003). Pharmacological characterization of the human P2Y₁₃ receptor. *Mol Pharmacol*, 64(1), 104-112.
- Medhurst, S J, Hatcher, J P, Hille, C J, Bingham, S, Clayton, N M, Billinton, A és Chessell, I P. (2008). Activation of the alpha7-nicotinic acetylcholine receptor reverses complete Freund adjuvant-induced mechanical hyperalgesia in the rat via a central site of action. *J Pain*, 9(7), 580-587. doi:10.1016/j.jpain.2008.01.336
- Mestre, C, Pelissier, T, Fialip, J, Wilcox, G és Eschalier, A. (1994). A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 32(4), 197-200.
- Mori, M, Heuss, C, Gähwiler, B H és Gerber, U. (2001). Fast synaptic transmission mediated by P2X receptors in CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slice cultures. *J Physiol*, 535(Pt 1), 115-123.
- Neary, J T, Zhu, Q, Kang, Y és Dash, P K. (1996). Extracellular ATP induces formation of AP-1 complexes in astrocytes via P2 purinoceptors. *Neuroreport*, 7(18), 2893-2896.
- Pankratov, Y, Castro, E, Miras-Portugal, M T és Krishtal, O. (1998). A purinergic component of the excitatory postsynaptic current mediated by P2X receptors in the CA1 neurons of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci*, 10(12), 3898-3902.
- Papp, L. (2009). *ATP szenzitív P2 receptorok szerepe a hippocampális neurotranszmitter (noradrenalin, GABA, glutamát) felszabadulás szabályozásában: fókuszban a P2X7 receptor* Semmelweis Egyetem. Retrieved from http://phd.semmelweis.hu/mwp/phd_live/vedes/export/papplilla.d.pdf
- Papp, L, Balazsa, T, Kofalvi, A, Erdelyi, F, Szabo, G, Vizi, E S és Sperlagh, B. (2004). P2X receptor activation elicits transporter-mediated noradrenaline release from rat hippocampal slices. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 310(3), 973-980. doi:10.1124/jpet.104.066712
- Pavlov, V A, Wang, H, Czura, C J, Friedman, S G és Tracey, K J. (2003). The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. *Mol Med*, 9(5-8), 125-134.
- Petruska, J C, Cooper, B Y, Gu, J G, Rau, K K és Johnson, R D. (2000). Distribution of P2X₁, P2X₂, and P2X₃ receptor subunits in rat primary afferents: relation to population markers and specific cell types. *J Chem Neuroanat*, 20(2), 141-162.
- Pfaffl, M W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9), e45.
- Raghavendra, V, Tanga, R Y és DeLeo, J A. (2004). Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. *European Journal of Neuroscience*, 20(2), 467-473. doi:DOI 10.1111/j.1460-9568.2004.03514.x
- Ralevic, V és Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological Reviews*, 50(3), 413-492.
- Ransohoff, R M. (2009). Chemokines and Chemokine Receptors: Standing at the Crossroads of Immunobiology and Neurobiology. *Immunity*, 31(5), 711-721. doi:DOI 10.1016/j.immuni.2009.09.010

- Ren, K és Dubner, R. (2010). Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nat Med*, 16(11), 1267-1276. doi:Doi 10.1038/Nm.2234
- Robaye, B, Boeynaems, J M és Communi, D. (1997). Slow desensitization of the human P2Y6 receptor. *Eur J Pharmacol*, 329(2-3), 231-236.
- Rodrigues, R J, Almeida, T, Richardson, P J, Oliveira, C R és Cunha, R A. (2005). Dual presynaptic control by ATP of glutamate release via facilitatory P2X1, P2X2/3, and P2X3 and inhibitory P2Y1, P2Y2, and/or P2Y4 receptors in the rat hippocampus. *J Neurosci*, 25(27), 6286-6295. doi:10.1523/jneurosci.0628-05.2005
- Sandkuhler, J. (2009). Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev*, 89(2), 707-758. doi:10.1152/physrev.00025.2008
- Sasaki, Y, Hoshi, M, Akazawa, C, Nakamura, Y, Tsuzuki, H, Inoue, K és Kohsaka, S. (2003). Selective expression of Gi/o-coupled ATP receptor P2Y12 in microglia in rat brain. *Glia*, 44(3), 242-250. doi:10.1002/glia.10293
- Scholz, J és Woolf, C J. (2007). The neuropathic pain triad: Neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci*, 10(11), 1361-1368. doi:Doi 10.1038/Nn1992
- Schumacher, W A, Bostwick, J S, Ogletree, M L, Stewart, A B, Steinbacher, T E, Hua, J, Price, L A, Wong, P C és Reh fuss, R P. (2007). Biomarker optimization to track the antithrombotic and hemostatic effects of clopidogrel in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 322(1), 369-377. doi:DOI 10.1124/jpet.106.119156
- Seltzer, Z, Dubner, R és Shir, Y. (1990). A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*, 43(2), 205-218.
- Shankar, H, Murugappan, S, Kim, S, Jin, J, Ding, Z, Wickman, K és Kunapuli, S P. (2004). Role of G protein-gated inwardly rectifying potassium channels in P2Y12 receptor-mediated platelet functional responses. *Blood*, 104(5), 1335-1343. doi:10.1182/blood-2004-01-0069
- Takasaki, J, Kamohara, M, Saito, T, Matsumoto, M, Matsumoto, S I, Ohishi, T, Soga, T, Matsushime, H és Furuichi, K. (2001). Molecular cloning of the platelet P2T(AC) ADP receptor: Pharmacological comparison with another ADP receptor, the P2Y(1) receptor. *Mol Pharmacol*, 60(3), 432-439.
- Tóth, B E, Vecsernyés, M, Zelles, T, Kádár, K és Nagy, G M. *Role of Peripheral and Brain-Derived Dopamine (DA) in Immune Regulation*. Retrieved from
- Tozaki-Saitoh, H, Tsuda, M, Miyata, H, Ueda, K, Kohsaka, S és Inoue, K. (2008). P2Y12 receptors in spinal microglia are required for neuropathic pain after peripheral nerve injury. *J Neurosci*, 28(19), 4949-4956. doi:10.1523/JNEUROSCI.0323-08.2008
- Tracey, K J, Beutler, B, Lowry, S F, Merryweather, J, Wolpe, S, Milsark, I W, Hariri, R J, Fahey, T J, 3rd, Zentella, A, Albert, J D és et al. (1986). Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science*, 234(4775), 470-474.
- Turek, J W, Kang, C H, Campbell, J E, Arneric, S P és Sullivan, J P. (1995). A sensitive technique for the detection of the alpha 7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor antagonist, methyllycaconitine, in rat plasma and brain. *J Neurosci Methods*, 61(1-2), 113-118.
- Vasiljev, K S, Uri, A és Laitinen, J T. (2003). 2-alkylthio-substituted platelet P2Y(12) receptor antagonist reveal pharmacological identity between the rat brain G(i)-linked ADP receptors and P2Y(12). *Neuropharmacology*, 45(1), 145-154. doi:Doi 10.1016/S0028-3908(03)00142-4
- von Kugelgen, I és Wetter, A. (2000). Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 362(4-5), 310-323.
- Webb, T E, Simon, J, Krishek, B J, Bateson, A N, Smart, T G, King, B F, Burnstock, G és Barnard, E A. (1993). Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett*, 324(2), 219-225.

- Xu, B, Stephens, A, Kirschenheuter, G, Greslin, A F, Cheng, X, Sennelo, J, Cattaneo, M, Zighetti, M L, Chen, A, Kim, S A, Kim, H S, Bischofberger, N, Cook, G és Jacobson, K A. (2002). Acyclic analogues of adenosine bisphosphates as P2Y receptor antagonists: phosphate substitution leads to multiple pathways of inhibition of platelet aggregation. *J Med Chem*, 45(26), 5694-5709.
- Zeilhofer, H U, Wildner, H és Yevenes, G E. (2012). Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiol Rev*, 92(1), 193-235. doi:10.1152/physrev.00043.2010

11. Saját publikációk

Az értekezés témájában megjelent publikációk

1, Contribution of platelet P2Y₁₂ receptors to chronic Complete Freund's Adjuvant-induced inflammatory pain.

Bekő K, Koványi B, Göloncsér F, Horváth G, Dénes Á, Környei Zs, Botz B, Helyes Zs, Mueller C, Sperlág B

J Thromb Haemost. 2017 Jun;15(6):1223-1235. doi: 10.1111/jth.13684.

2, Central P2Y₁₂ receptor blockade alleviates inflammatory and neuropathic pain and cytokine production in rodents.

Horváth G, Göloncsér F, Csölle C, Király K, Andó RD, Baranyi M, Koványi B, Máté Z, Hoffmann K, Algaier I, Baqi Y, Müller CE, Von Kügelgen I, Sperlág B.

Neurobiol Dis. 2014 Oct;70:162-78. doi: 10.1016/j.nbd.2014.06.011. Epub 2014 Jun 25.

Egyéb publikációk

1, A genetic study of 12 X-STR loci in the Hungarian population.

Horváth G, Zalán A, Kis Z, Pamjav H.

Forensic Sci Int Genet. 2012 Jan;6(1):e46-7. doi: 10.1016/j.fsigen.2011.03.007. Epub 2011 Apr 3. No abstract available.

2, Allele distribution of the new European Standard Set (ESS) loci in the Hungarian population.

Molnár A, Zalán A, Horváth G, Pamjav H.

Forensic Sci Int Genet. 2011 Nov;5(5):555-6. doi: 10.1016/j.fsigen.2010.06.002. Epub 2010 Jul 4. No abstract available.

12. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindenkinek, aki közreműködött abban, hogy ez a dolgozat elkészülhessen.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Sperlágh Beáta professzorasszonynak, aki lehetővé tette számomra, hogy a Semmelweis Egyetem Szentágothai Doktori Iskola képzésében részt vehessek és szakmai segítséget nyújtott számomra.

Köszönöm minden kollégámnak, aki segítségemre volt. Hálásan köszönöm Baranyi Máriának, a HPLC méréseket, Csölle Cecéliának a gyulladáscsökkentő citokin méréseket, Dénes Ádámnak, hogy megtanította a subdiaphragmaticus vagotómiát, Király Kornélnak, hogy megmutatta, hogyan kell intrathecalisan kezelni állatokat, Gölöncsér Flórának és Andó Rómeónak, hogy megtanították a viselkedésvizsgálatokat.

Külön köszönöm kollaborációs partnereinknek: Ivar von Kügelgennek az *in vitro* affinitásvizsgálatokat és Christa E. Müllernek, hogy rendelkezésünkre bocsátotta az általunk használt potens és szelektív P2Y₁₂ receptorantagonista, PSB-0739-et.

Fontosnak tartom megemlíteni családom segítségét és támogatását, ami szintén hozzájárult ahhoz, hogy ez a dolgozat létrejöhessen. Köszönöm!