

P2Y₁₂ receptor részvétele különböző állatkísérletes
fájdalom modellekben: in vivo
viselkedésfarmakológiai vizsgálatok és a
háttérmechanizmus felderítése

doktori tézisek

Horváth Gergely

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai 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. Szőkő Éva, MTA doktora, egyetemi tanár

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

Dr. Zelles Tibor, PhD., egyetemi tanár

Budapest

2017

1.Bevezetés

A fájdalom egy kellemetlen emocionális és szenzoros tapasztalat, mely alapvető és nélkülözhetetlen az életben maradáshoz, ugyanis a tényleges és potenciális szöveti károsodásról tájékoztat. A fájdalomcsillapítás a gyakorló orvos alapvető tevékenysége és kötelessége, ezért nem meglepő, hogy a fájdalomcsillapítók a leggyakrabban rendelt és alkalmazott gyógyszerek közé tartoznak. A különböző fájdalomcsillapító készítmények azonban igen eltérőek hatás és mellékhatás, tolerancia-dependencia valamint biztonság szempontjából, ezért intenzív kutatómunka folyik új fájdalomcsillapító gyógyszer-célpontok azonosítására és az azokon ható gyógyszerek kifejlesztése céljából. Az immunrendszer és az idegrendszer kapcsolatáról tudjuk, hogy egymásnak mellérendelt utakon képesek egymás működését befolyásolni. A gyulladáshoz vezető mediátorok a fájdalom transzmisszióban is fontos szerepet töltenek be, nemcsak lokálisan az akut gyulladáshoz vezető folyamatokban, hanem szubakut és krónikus intervallumok során a központi idegrendszerben is. Az adenosin trifoszfát (ATP) univerzálisan jelenlevő vegyület az élő szervezetben. Azon túl, hogy a sejt energiaellátásában játszik szerepet, fontos jelátviteli funkcióval rendelkezik. Az idegi aktivitás, fizikai behatás, sejtpusztulás, valamint gyulladás során felszabaduló ATP és metabolitjai purin receptorokon (P1, P2X valamint P2Y receptorok) fejtik ki hatásaikat. A purinerg receptorok széleskörű expressziójából arra lehet következtetni, hogy fontos szerepet játszanak különböző idegrendszeri kórképekben és a fájdalom jelátviteli folyamataiban is. A humán P2Y₁₂ receptort 2001-ben klónozták először, azóta ismerjük a receptor pontos aminosav sorrendjét, térbeli szerkezetét és a legfontosabb tulajdonságait. A P2Y₁₂ receptor a vérlemezke ADP receptora, de megtalálható endothéliumon, simaizom sejteken, illetve a központi idegrendszerben mikrogliaon. A P2Y₁₂ receptor fájdalomban betöltött szerepéről szóló első tanulmányok a 2006 körül jelentek meg. Kimutatták, hogy különböző neuropátiás fájdalom modellekben gerincvelői mikroglia sejteken a P2Y₁₂ receptor mRNS expresszió fokozódik, illetve P2Y₁₂ receptorantagonista (MRS2395) és receptor antiszensz oligonukleotid kezelés következtében az állatokban csökkent a mechanikus allodynia illetve a termális hiperalgészia mértéke.

2. Célkitűzések

A szakirodalomban eddig csak neuropátiás fájdalom vonatkozásában vizsgálták a P2Y₁₂ receptort, a vizsgálatokban használt antagonisták pedig nem voltak szelektívek a receptorra. A P2Y₁₂ receptoron történő fájdalomcsillapítás lehetséges mechanizmusa sem egyértelmű. Az imént említett okok indokolják a P2Y₁₂ receptor különböző típusú fájdalomban való részvételét igazoló további vizsgálatokat. A vizsgálataink az alábbi kérdésköröket érintették:

2.1. P2Y₁₂ receptor gátlás vizsgálata fájdalom különböző állatmodelljeiben

P2Y₁₂ receptor antagonistákat alábbi fájdalom modellekben teszteltük.

- Akut fájdalom
- CFA indukálta gyulladássos fájdalom
- Neuropátiás fájdalom (Seltzer modell)

A farmakológiai vizsgálatok megerősítéseként ezekben a modellekben megvizsgáltuk P2Y₁₂ receptor génkiütött egerek nocifenzív viselkedését is.

2.2. P2Y₁₂ receptor antagonisták farmakológiai aktivitásának felmérése

A transzfektált sejtvonalakon történő vizsgálatok kollaborációs partnerünk (Prof. Ivar von Kügelgen, Department of Pharmacology and Toxicology, University of Bonn, Németország) laboratóriumában történtek. A vizsgálatok során a P2Y₁₂ receptor antagonisták hatását vizsgáltuk isoproterenol illetve forskolin által kiváltott cAMP szint emelkedésre, 2-MeSADP gátló hatásával szemben.

2.3. A P2Y₁₂ receptor gátlással okozott hatások háttérmechanizmusainak felderítése

A vizsgálataink első részében kapott hatások lehetséges háttérmechanizmusait molekuláris biológiai technikák alkalmazásával derítettük fel. Az efferens hatásmechanizmust in vivo viselkedésfarmakológiai tesztekkel vizsgáltuk.

2.4. P2Y₁₂ receptor antagonisták esetleges mellékhatásainak vizsgálata

A P2Y₁₂ receptor gátlás esetleges mellékhatásait in vivo és ex vivo kísérletekkel vizsgáltuk meg

3. Módszerek

3.1. Kísérleti állatok

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. 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.

3.2. Kezelések

Kísérleteinkben az alábbi antagonisták megfelelő dózisait intraperitoneálisan (ip.) illetve intrathecalisan (it.) adtuk 100-200 µL, illetve 5 µL végtérfogatban 30, illetve 15 perccel a mérések előtt:

- MRS2395 (ip.)
- cangrelor (ip.)
- reactive blue 2 (ip.)
- clopidogrel (ip.)
- ticlopidine (ip.)
- PSB-0739 (it.)

3.3. Fájdalom modellek

3.3.1. Akut termális fájdalom

Az akut termális fájdalom küszöböt emelkedő hőmérsékletű hot plate analgesia méterrel (IITC, Woodland Hills, CA, USA) mértük meg. A kísérleti állatokat egyenként 25°C hőmérsékletű talapatú, plexi vizsgálókamrában helyeztük el, 10 perc akklimatizáció után a fém aljzat hőmérsékletét 6°C/perc sebességgel folyamatosan emeltük. A termális fájdalom küszöb (PWT, paw withdrawal threshold) megjelenésének az első alkalommal, bármely végtagon megfigyelhető végtagnyalogatást vagy elrántást tekintettük, ekkor a kísérletet leállítottuk, az aljzat hőmérsékletét pedig regisztráltuk. Valamennyi állaton kondicionáló mérést követően két kontrollmérést végeztünk 30 perc időközönként, ezek

átlagát tekintettük kontroll értéknek. Ezt követően az állatokat antagonistával kezeltük és megmértük az antagonisták hatását.

3.3.2. CFA indukált gyulladásoos fájdalom

A kísérleti állatok jobb hátsó végtagjának plantaris felületébe komplett Freund adjuvánst (CFA, Sigma) injektáltunk (50% oldat 100 μ L/patkány, 30 μ L/egér). Az egerek CFA kezelését izoflurános enyhe bódításban végeztük el. A kezelés előtt, valamint 48- illetve 96 órával a CFA injekciót követően mechanikus végtag elrántási 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 lábón. A mechanikus allodynia mellett a gyulladt végtag térfogat növekedését - ödémáját is megmértük plethysmometer segítségével (Ugo Basile plethysmometer, Stoelting, Wood Dale, IL, USA).

3.3.3. Neuropátiás fájdalom modell

A kísérleti állatokon altatásban jobb oldali ülőideg részleges lekötést végeztünk. A beavatkozást megelőzően, illetve az azt követő 7. napon mechanikus végtag elrántási küszöbértéket mértünk von Frey módszerrel a műtött és az ellenoldali végtagokon. Az antagonisták hatását is a 7. napon mértük meg a gyulladásoos fájdalom modellben leírt módszer szerint.

3.4. Molekuláris biológiai vizsgálatok

3.4.1. Kvantitatív Real-Time PCR P2Y₁₂R mRNS expressziójának vizsgálatára

A patkányok jobb hátsó végtagjának plantaris felületébe CFA-t injektáltunk. 48 illetve 96 óra elteltével mintát vettünk az ödémás talpból és a gerincvelő lumbális szakaszából. 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. A génexpresszió szintjét a cDNS mintákban kvantitatív Real-Time PCR (Rotor-Gene 3000; Corbett Research, Sydney, Australia) segítségével határoztuk meg. A target gének expressziós szintjét a referencia gén (18S rRNS) expressziójára normalizáltuk.

3.4.2. Interleukin 1-béta expresszió mérése ELISA módszerrel

A kísérleti állatok jobb hátsó végtagjának plantaris felületébe komplett Freund adjuvánst (CFA, Sigma) injektáltunk (100 µL 50% oldat) és 48, illetve 96 óra elteltével mintát vettünk a gyulladt talpból és a gerincvelő lumbális (L4-6) szakaszából. A szövetmintákat homogenizáltuk, majd centrifugáltuk, végül a felülúszót 500 µL Tris-HCl pufferben gyűjtöttük össze. Az IL-1β produkciót az egér és patkány IL-1β-ra specifikus, DuoSet IL-1β (R&D System, Minneapolis, MN, USA) ELISA kittel határoztuk meg, a gyártó utasításának megfelelően, mely a pro-IL-1β 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-1β produkcióra pg/ml-ben fejeztük ki.

3.4.3. Multiplex citokin mérés Luminex platform segítségével

A kísérleti állatok jobb hátsó végtagjának plantaris felületébe CFA-t, illetve fiziológiás sóoldatot injektáltunk. A kísérleti állatokat a CFA injekció után 48, illetve 96 órával a kiválasztott ligandokkal kezeltük. A gyulladt perifériás szövetet, illetve a gerincvelő lumbális (L4-L6) szegmenseit szárazjégen kiperaráltuk és -70 °C-on tartottuk a további feldolgozásig. A vizsgált gyulladáscitokinek szintjét a szövetmintákban az R&D Systems mikrogyöngy-alapú Fluorokine® MultiAnalyte Profiling kitjeinek felhasználásával Luminex-xMAP multiplex platformon határoztuk meg. A szövetmintákat homogenizáltuk és centrifugáltuk. A felülúszót 500 µL Tris-HCl pufferben gyűjtöttük össze. A méréseket 96 lyukú filter microplate-en végeztük. A mérések kivitelezése a SE Fluoreszcens Technikák Közös Használatú Laboratóriumában történt. A CFA és egyéb kezelések hatását a citokin produkcióra abszolút értékben (pg/ml) fejeztük ki.

3.4.4. Citokin mérés FACS segítségével

A kísérleti állatok jobb hátsó végtagjának plantaris felületébe CFA-t, illetve fiziológias sóoldatot injektáltunk, majd 48 óra elteltével a kezelt végtag talppárnájából mintát vettünk. A mintákat -80°C -on tároltuk a feldolgozásig. A protein-assayhoz és citokin-méréshez a homogenizált és centrifugált minták felülúszóját használtuk. A IL- 1β proinflammatorikus citokin koncentrációját BD Cytometric Bead Array (CBA) Flex Sets (BD Biosciences) segítségével mértük meg. Az áramlásos citometriás méréseket 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 Perkin Elmer Victor 3V 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer, USA) készülék segítségével.

3.4.5. HPLC analízis

A kísérleti állatok jobb hátsó végtagjának plantaris felületébe CFA-t injektáltunk. Az injektálást megelőzően szisztémás 6-OHDA illetve fiziológias sóoldat előkezelést alkalmaztunk. A HPLC analízis során a gyulladt perifériás szövet monoamin és monoamin metabolitjainak tartalmát határoztuk meg. A gyulladt talpmintát homogenizáltuk, majd centrifugálást követően KOH-ot adtunk a mintához és ismét centrifugáltuk. A folyadékkromatográfiás rendszert a 715 operation software segítségével kezeltük (Gilson Medical Electronics inc., Middletown, and WI USA). Az eluenst BAS 400 típusú elektrokémiai detektorhoz kapcsoltuk (szén elektród vs. Ag/AgCl referencia elektród) az oxidációs potenciált 0.75 V Eltron potenciosztáttal tartottuk fennt. A minták dúsítását követően szeparáltuk az analitokat. Az analízishez IP puffert használtunk és 0.98 mL/perc áramlási sebességet alkalmaztunk.

3.5. Mellékhatás vizsgálatok

3.5.1. Rotarod teszt

A kísérletekben 140-190g közötti testtömegű, hím Wistar patkányokat használtunk. A mozgáskoordináció vizsgálatot az IITC (Woodland Hills, CA, USA) Rotarod készülékkel mértük. Az állatok mozgáskoordinációját 300 sec periódusokban teszteltük,

emelkedő sebességű forgórúddal. A kísérletet 2 napon át tartó tréningperiódus előzte meg. A tesztnapon felvettük a leesési látencia alapértékét, és azokat az állatokat, amelyeknél 60 sec alatti látenciát mértünk, kizártuk a vizsgálatból. Ezt követően az állatokat fiziológiás sóoldattal, illetve a kiválasztott antagonistákkal kezelve ismét megmértük a leesési látenciát.

3.5.2. *Ex vivo* trombocita aggregáció mérése

Az állatokat ip./it. kezeltük a hatóanyagokkal, illetve fiziológiás sóoldattal, majd 30, illetve 15 perccel a kezelést követően az állatokat elaltattuk, és 3 ml vért vettünk a szívből. A mintákat 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. A mérésekhez használt küvetákba 450-450 μ L PRP-t, illetve PPP-t pipettáztunk, majd a vérelemezkek aggregációját indukáltuk. Vizsgálatainkat a Born-féle turbidimetriás elven működő Carat TX-4 (Carat Diagnosztika Kft., Budapest) négycsatornás thrombocyta-aggregométerrel végeztük.

3.6. P2Y₁₂ receptorantagonisták in vitro hatékonyságvizsgálata

Az in vitro vizsgálatokban 1321N1 astrocytoma sejtvonalakat, illetve kínai hörcsög ovárium (CHO Flip-In) sejteket használtunk. A sejteket ezt követően 10 nM isoproterenollal illetve 10 μ M forskolinnal stimuláltuk, a P2Y₁₂ receptor agonista 2-meSADP jelenlétében, illetve hiányában. Az antagonistákat 10 perccel az agonista adás előtt adtuk. A szupernatánsban megjelenő cAMP szintet a kísérletek egy részében cAMP binding protein, valamint [3H]-cAMP (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) hozzáadását követően folyadék szcintillációs spektrometriával mértük. A CHO sejteken a cAMP választ Cre-függő luciferáz assay segítségével határoztuk meg. A szupernatáns luciferáz aktivitását luminométerrel mértük (Bethold Technologies, Bad Wildbad, Germany). A kapott adatokból gátló agonista koncentráció-hatásgörbéket vettünk fel és meghatároztuk az egyes görbékhez tartozó IC₅₀ értékeket. Ezt követően határoztuk meg az antagonisták K_b és pA₂ értékét, a pK_B = log(dose ratio - 1) - log[B], és a pA₂ = -logK_b összefüggések felhasználásával.

3.7. Szubdiafragmatikus vagotómia (VGX)

Ketamin-xylazinos altatást követően abdominális középvonali vágást ejtettünk az állaton. Műtéti mikroszkóp segítségével megkerestük a bolygóideget (*n. vagus*) és eltávolítottuk 1.5 cm-es darabjait anterioralis és posterioralisán egyaránt. A sebet bezártuk, az állatoknak szubkután 10 mL fiziológiás sóoldatot adtunk és egyenként helyeztük el őket ketrecekben, melyeket puha aljzattal láttunk el. A végtag elrántási 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. Eredmények

4.1. P2Y₁₂ receptor antagonisták antinociceptív hatásai a különböző fájdalom modellekben

Akut fájdalom tesztben az általunk vizsgált antagonisták közül négynek volt szignifikáns fájdalomcsillapító hatása. Az MRS2395, a ticlopidine, a clopidogrel dózisfüggő fájdalomcsillapító hatással rendelkezett, a reactive blue 2-nak, a cangrelornak, valamint az intraperitoneálisan (ip.) adagolt PSB-0739-nek nem volt hatása. Az intrathecalisan (it.) adagolt PSB-0739 dózisfüggetlen, szignifikáns hatású volt. A klinikumban is használt antagonisták (ticlopidine, clopidogrel) magasabb dózisokban voltak hatékonyak, az MRS2395 alacsonyabb dózisban szignifikáns hatással bírt. A leghatékonyabb a potens és szelektív P2Y₁₂ receptor antagonista PSB-0739 intrathecalis adagolással volt.

A gyulladásoz fájdalom modellben az általunk vizsgált összes antagonistának dózisfüggő, szignifikáns antiallodynias hatása volt. A klinikumban is használt antagonisták ismét nagyobb dózisban voltak hatásosak. A ticlopidine volt az egyetlen vegyület, amely képes volt a gyulladt végtag térfogatát is csökkenteni, amiből arra következtettünk, hogy gyulladásoz fájdalom esetén az ödéma manifesztációja és csökkenése független a végtagelrántási küszöbérték változásától. A minimális hatékony dózis alapján felállított rangsor alapján a leghatékonyabb antagonisták a PSB-0739 (it.) illetve a cangrelor voltak.

Neuropátiás fájdalom modellünkben öt antagonista volt hatékony az általunk tesztelt vegyületek közül. Az antagonisták dózishatás görbéi laposabbak voltak, mint a

gyulladásos fájdalom modellben. A ticlopidine ismét magasabb dózisban volt hatékony és a legmagasabb (100 mg/kg) dózisban az alap végtagelrántási küszöbérték körüli értékre hozta vissza a mechanikus allodyniát. A reactive blue 2 és ip. adagolású PSB-0739 nem volt hatékony ebben a tesztben. A gyulladásos fájdalom modellhez hasonlóan ebben a tesztben is az it. adagolt PSB-0739 és a cangrelor voltak a leghatékonyabbak és a klinikumban használt antagonisták voltak a legkevésbé hatékonyak.

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
Gyulladásos fájdalom	Dózisfüggő	Dózisfüggő	Dózisfüggő	Dózisfüggő	Dózisfüggő	Dózisfüggő
Neuropátiás fájdalom	Dózisfüggő	Dózisfüggő	Dózisfüggő	-	Dózisfüggő	Dózisfüggő

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

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

A farmakológiai vizsgálatokat megerősítendő megvizsgáltuk génkiütött állatok nocifenzív viselkedését is mindhárom fájdalom modellben. Akut fájdalom esetén a P2Y₁₂ receptor génkiütött egerek magasabb hőmérsékleten mutattak nocifenzív viselkedést, mint vad típusú alomtársaik. A gyulladásos fájdalom modellben az intraplantáris CFA injekciót követően genotípustól függetlenül jelentős mértékű végtagelrántási küszöbérték csökkenést tapasztaltunk, ám a P2Y₁₂ receptor génkiütött egerek enyhébb fokú, szignifikánsan különböző allodyniát mutattak a vad típusú egerekéhez képest. A neuropátiás fájdalom modellben is hasonló eredményre jutottunk: Az ülőideg részleges lekötését követően mindkét genotípus (P2Y₁₂ receptor génkiütött és vad típusú) esetén kialakult az allodyniás küszöbértékek szignifikáns csökkenése, de

a P2Y₁₂ receptor hiányos egerek enyhébb fokú, szignifikánsan eltérő mértékű fájdalmi reakciót adtak, mint a vad típusú egerek.

4.2 Hatásmechanizmus vizsgálat

Molekuláris biológiai módszerekkel a P2Y₁₂ receptor gátlás okozta analgetikus hatások háttérmechanizmusaira kerestük a választ.

CFA indukálta gyulladási fájdalom modellünkben a P2Y₁₂ receptor mRNS és az interleukin-1 béta expressziójának időfüggését tapasztaltuk. A gyulladt talpban 48 órával a kezelést követően megemelkedett a P2Y₁₂ receptor mRNS és az IL-1 β szint is. A gerincvelőben ehhez képest csak egy későbbi időpontban 96 órával a CFA indukciót követően tapasztaltuk ezt a hatást.

A PSB-0739 és a cangrelor központi idegrendszeri- és perifériás gyulladt szövet citokin szintjeire gyakorolt hatását Luminex Multiplex citokin array-jel és FACS-szal mértük meg. A potens és szelektív P2Y₁₂ receptor antagonistá PSB-0739 csökkentette a gyulladt talp IL-1 β , TNF α , IL-10 és IL-6 szintjeit, valamint a gerincvelői IL-1 β szintet. A cangrelor hatással volt a gyulladt perifériás szövet TNF α és IL-10, valamint a gerincvelői IL-1 β szintekre.

Az intraplantáris CFA által keltett proinflammatorikus interleukin-1 béta szinteket is megmértük P2Y₁₂ receptor génkiütött és vad típusú állatokon. A gyulladt végtag IL-1 β szintje megemelkedett mindkét genotípusban, ezzel szemben a gerincvelői P2Y₁₂ receptor KO (knockout) állatok IL-1 β szintje elmaradt a vad típusú állatokéhoz képest.

3. táblázat P2Y₁₂ farmakológiai és genetikai blokádjának a hatása a gyulladt végtag és a gerincvelői citokinszintjeire

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

Intraplantáris CFA kezelés hatása

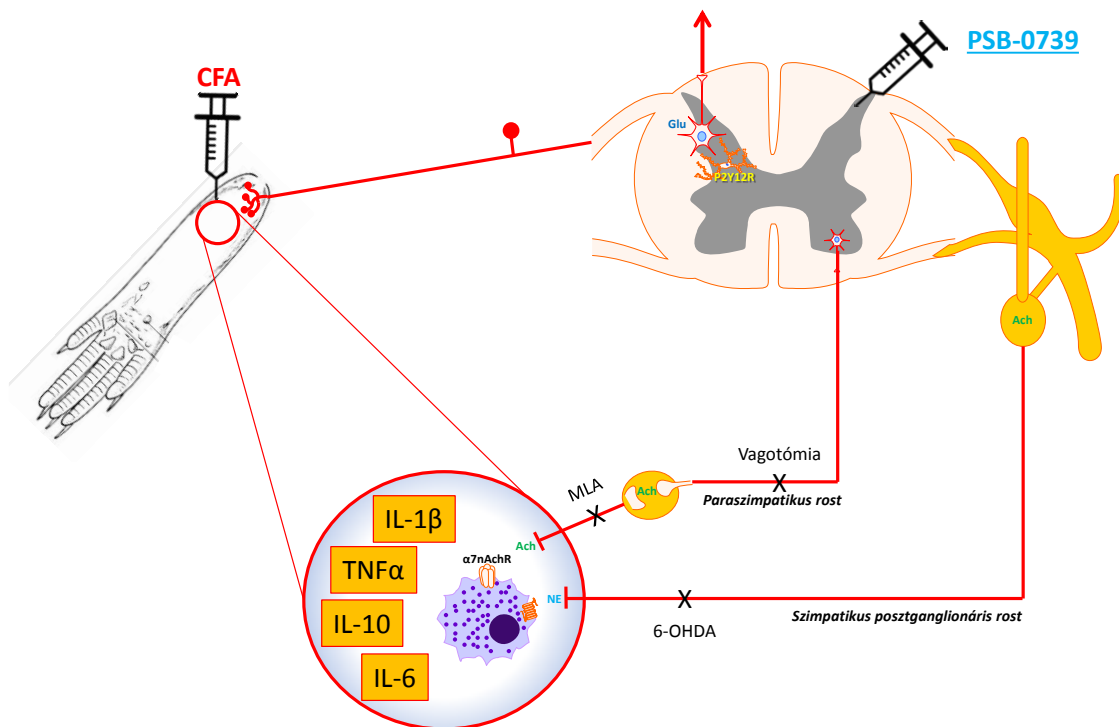
	Gyulladt végtag		Gerincvelő	
	P2Y12 +/+	P2Y12 -/-	P2Y12 +/+	P2Y12 -/-
IL-1 β	↑	↑	↑	-

A centrálisan adagolt PSB-0739 tehát nemcsak a fájdalmi reakciókat és a gerincvelői proinflammatorikus citokinek mennyiségét befolyásolta, de hatással volt a gyulladás helyén termelődő citokinek mennyiségére is, ami efferens hatásmechanizmust sejtet.

Az efferens hatásmechanizmus felderítése érdekében egy új kísérlet sorozatot indítottunk. Az állatok egy csoportjában szisztémás 6-OHDA (6-hidroxi-dopamin) kezeléssel blokkoltuk a szimpatikus rostokat, egy másik kísérleti csoportban pedig MLA-val (metilakonitin, $\alpha 7$ nikotinos acetilkolin receptor antagonist) gátoltuk a kolinerg rostokat. A kezelések nem voltak hatással az alap végtagelrántási küszöbértékre. A CFA előidézte a mechanikus allodyniát mindkét előkezelést követően. A PSB-0739 antiallodyniás hatású volt a 6-OHDA előkezelt csoportban, ám hatástalan az MLA kezelt állatokon. Az MLA tehát felfüggesztette a PSB-0739 analgetikus hatását. Ezt megerősítendő egy új kísérletben szubdiafragmatikus vagotómiát végeztünk el az állatokon ugyan ebben a kísérletes paradigmában. A vagotómia önmagában nem befolyásolt a mechanikus végtagelrántási küszöbértéket. Az intraplantáris CFA kezelés hatására az küszöbérték csökkenését tapasztaltuk. A PSB-0739 pedig nem befolyásolta a csökkent fájdalomküszöböt.

Ez a kísérlet sorozat a PSB-0739 általunk feltételezett hatásmechanizmusát tárta fel (**1. ábra**). Intraplantáris CFA injekciót követően a talpban gyulladással járó folyamatok indulnak meg. A primér afferens rost a gerincvelő hátsó szarvban található projekciók illetve interneuronokhoz kapcsolódik továbbítva az ingerületet felsőbb agyi struktúrák felé. A gerincvelőbe injektált PSB-0739 központi fájdalomcsillapító hatását közvetlenül neuronon és aktivált mikrogliaon fejti ki, indirekt módon azonban képes a perifériás gyulladással járó citokinszintet is befolyásolni. Szubdiafragmatikus vagotómia, illetve szisztémás antikolinerg kezelés (MLA) azonban felfüggesztette a P2Y12 receptor

szelektív antagonistá PSB-0739 hatását, ezért vélhetőleg a PSB efferens hatása paraszimpatikus, kolinerger rostok közvetítésével történik.



1. ábra. A PSB-0739 általunk feltételezett hatásmechanizmusa.

4.3 P2Y₁₂ receptorantagonisták in vitro vizsgálata

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. Hatását megvizsgáltuk a kínai hörcsög ovárium sejtes modellben is. A PSB-0739-nek (30 nM) nem volt jelentős hatása az alap cAMP szintre. A 2-MeSADP koncentráció-hatás görbéje a PSB-0739 (30 nM) jelenlétében párhuzamosan jobbra tolódott. A PSB-0739 (30 nM) önmagában nem hatott a forskolin (10 μM) által kiváltott sejtes cAMP szint emelkedésre. A PSB-0739 tehát potens és szelektív P2Y₁₂ receptorantagonista.

Suramin (3, 10, 30 μM) jelenlétében a 2-MeSADP koncentráció hatás görbéje párhuzamosan jobbra tolódott, a maximális hatás szignifikáns befolyásolása nélkül. 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. A suraminról elmondható, hogy nem-szelektív vegyület és affinitása alacsony a P2Y₁₂ receptorhoz.

A reactive blue 2 kompetitív antagonistaként viselkedett a vizsgálatok során, a suraminnál hatékonyabbnak bizonyult, de több P2Y receptoron is hatott. A P2Y₆ receptoron 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.

A cangrelor az első kísérleti modellben a PSB-0739-hez hasonló hatáserősséget mutatott. A 2-MeSADP hatását gátolta, szelektivitását tekintve azonban a PSB-0739-től eltérően antagonizálja a humán P2Y₁₃ receptorokat is. A cangrelornak önmagában (100 nM) a CHO sejtes modellben nem volt hatása a bazális cAMP produkcióra. A cangrelor (100 nM) jelenlétében a 2-MeSADP gátló koncentráció-hatás görbéjének párhuzamos jobbrtolódását tapasztaltuk. A PSB-0739-hez hasonlóan a cangrelor sem befolyásolta számottevően a forskolin (10 μM) által kiváltott sejtes cAMP szint emelkedést. A cangrelor tehát potens P2Y₁₂ és P2Y₁₃ receptorokon ható antagonistája.

Az MRS2395 hatását humán P2Y₁₂ receptorral transzfektált CHO sejteken vizsgáltuk meg. Az MRS2395 (20 μM) nem befolyásolta a bazális cAMP termelést. A 2-MeSADP dózishatásgörbéjén nem tapasztaltunk MRS2395 által előidézett párhuzamos jobbrtolódást. 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. Az MRS2395 (20 μM) P2Y₁₂ receptoragonista hiányában, szignifikáns - forskolin által kiváltott - cAMP szint emelkedést okozott, és ugyanilyen eredményt kaptunk az ál- transzfektált sejteken is. Az MRS2395 tehát a vizsgált koncentrációban nem gátolja a humán P2Y₁₂ receptort. Az MRS2395 eddig vélt P2Y₁₂ receptor antagonizáló tulajdonsága natív patkány trombocitákon kapott közvetett adatokon alapult. Eredményeink azt mutatják, hogy az itt tapasztalt cAMP szintet fokozó hatása feltehetően P2Y₁₂ receptortól függetlenül, foszfodiészteráz gátlással függhet össze. A pro-drog clopidogrel és ticlopidine ebben a rendszerben nem

vizsgálható, ezért ennek a két antagonistának hatásait csak *in vivo* kísérletekben néztük meg.

4. 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% ^{s,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)

4.4 Mellékhatásvizsgálatok

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 antagonistában esetében a fájdalomtesztekben hatékonyan bizonyuló dózist és adagolási módot választottuk. 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 rotarod tesztperiódusa 300 másodperc volt, az általunk vizsgált antagonisták közül egyik sem befolyásolta a leesési látencia értékeket.

Az *ex vivo* trombocita aggregáció gátlás mérésekor ADP-vel indukáltunk trombocita aggregációt, az aggregáció mértékének kifejezésére a maximális aggregáció mértékét (A_{max}) vettük figyelembe. Naiv állatokban az ADP (5-10 μ M) koncentrációtól függően indukálta a trombocita aggregációt. A 10 μ M ADP-vel indukált maximális

trombocita aggregáció értékéhez hasonló eredményt tapasztaltunk fiziológias sóoldat intraperitoneális adagolását követően 30 perccel. A cangrelor szignifikánsan csökkentette az A_{max} mértékét, a PSB-0739 pedig szignifikánsan fokozta a trombocita aggregációt. A cangrelorral kapott eredmények korrelálnak a $P2Y_{12}R$ antagonisták antiaggregáns hatásait bemutató közlemények, ami kardiovaszkuláris rizikó szempontjából inkább előnyös hatású.

5. Következtetések

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

5.1. $P2Y_{12}$ receptorgátlás vizsgálata fájdalom különböző állatmodelljeiben.

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

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, $P2Y_{12}$ blokádnak hatására a citokin szintje csökken. Génkiütött egerekben a gerincvelői IL-1 béta szint változatlan maradt CFA kezelést követően. A $P2Y_{12}$

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

5.2. 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 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 antagonistát 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.

5.3. A P2Y₁₂ receptor gátlással okozott hatások háttérmechanizmusainak felderítése

A vizsgálataink első részében kapott hatások lehetséges mechanizmusait molekuláris biológiai technikák alkalmazásával derítettük fel. 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. Farmakológiai blokádot és műtéti denervációt követően a citokin szintek változását vizsgáltuk, hogy a P2Y₁₂ receptor gyulladásos 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 antagonistát PSB-0739 intrathecalis adagolással csökkentette a perifériás és centrális emelkedett gyulladásos citokin szinteket.

A szimpatikus posztganglionáris rostok farmakológiai blokádját nem függesztette fel a PSB-0739 hatását, ezzel szemben a szisztémásan adagolt nAChR α 7 antagonistát MLA felfüggesztette a PSB-0739 fájdalomcsillapító-, valamint a gyulladásos citokinek szintjére gyakorolt hatását. A subdiaphragmaticus vagotómia is kivédte a PSB-0739

fájdalomcsillapító hatását. Eredményeinket összegezve arra következtethetünk, hogy a potens és szelektív antagonistá PSB-0739 gyulladássos fájdalomra gyakorolt hatása kolinerg efferenciájú.

5.4. 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.

6. Saját publikációk jegyzéke

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

Journal of Thrombosis and Haemostasis. Elfogadva 2017. március 13.

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.