

Számos kísérleti bizonyíték van arra, hogy a szenzoros neuronok perifériás végződéseiből felszabaduló neuropeptidok modulálják a gyulladásos folyamatokat. A felszabaduló proinflammációs és antiinflammációs peptidok és a gyulladásos sejtek közötti kölcsönhatásokat vizsgáltuk több akut és krónikus gyulladásos kísérleti modellben. A kutatási terv fő célkitűzése az volt, hogy jellemezzük a szenzoros idegelemek mediátorai, illetve a tranziens receptor potenciál vanilloid 1 (TRPV1) receptor által közvetített immunmodulátor hatásokat, az oxazolonnal indukált allergiás kontakt dermatitisz modellben, a forbol-12-mirisztát acetáttal, illetve acetonnal indukált akut gyulladásban egérfülön, valamint lokális bleomycin krónikus adásával kiváltott bőrszkerózisban, egerek hátbőrén. Kísérleteinket farmakológiai, hisztológiai, immunológiai és molekuláris biológiai vizsgáló módszerekre alapoztuk. A TRPV1 receptor, a neurokinin 1 receptor, a calcitonin gén-rokon peptid (CGRP) és a szomatosztatin szerepét vizsgáltuk. (Kutattuk továbbá a TRPV1 receptor, illetve a szomatosztatin légúti és ízületi gyulladásokban betöltött szerepét is. Az eredményeket Dr. Helyes Zsuzsanna K-46635-ös számú OTKA pályázati jelentésében részleteztük.)

***A 4 éves periódus alatt 22 eredeti közleményt, 2 könyvfejezetet, és 2 folyóiratban megjelent tanulmányt publikáltunk. A kongresszusi előadások és poszterek száma 40 volt. A megjelent közlemények kumulatív impakt faktora:60.55***

Főbb eredményeink a következők:

#### **1: Oxazolonnal kiváltott kontakt dermatitisz modellen, egérfülön**

Kísérleteinkhez BALB/c, Sv129+C57BL/6 törzsű NK<sub>1</sub>- valamint C57BL/6 törzsű VR<sub>1</sub> receptor hiányos transzgenikus egereket, illetve ezek vad típusait használtuk. Ketamin (100 mg/kg i.p., szükség szerint ismételve), xylazin (5 mg/kg i.m.) narkózisban végeztük a kísérleteket. 50-50 µl 2%-os oxazolonnal hasbőrre kenésével szenzitizáltuk az állatokat. A 6. napon a fülre adtunk 2%-os oxazolont (15-15 µl/fül külső ill. belső oldala). A kontroll csoportban 96%-os alkoholt alkalmaztunk, azonos volumenben. A BALB/c egerek egy csoportjánál szisztémás resiniferatoxin-előkezelést alkalmaztunk, a szenzoros neuropeptidok depléciójára. Az NK1 receptorokat specifikus antagonistá, SR140333-mal gátoltuk.

***Füldödéma mérése:*** A fül duzzadását mikrométerrel mértük 72 órán keresztül, 0,1 mm pontossággal és a növekedés százalékában fejeztük ki. A maximális fülduzzadás 80-150%-os volt, mely 24-48 óra múlva alakult ki a DTH-ban. 72 óra múlva már szignifikáns csökkenést mértünk. A szenzoros neuropeptidok szisztémás RTX-előkezeléssel okozott depléciója

jelentősen (40%-al) növelte a duzzadást BALB/c egéren. Az NK<sub>1</sub> receptorok hiánya csökkentette, a VR1 receptorok hiánya növelte a fülödémát DTH-ban.

Hisztológiai vizsgálatok: A fülekből paraffinos beágyazás után haematoxylin-eozinnal festett metszeteket készítettünk. A szövettani változásokat szemikvantitativ szövettani score segítségével értékeltük. A hisztológiai vizsgálatok alátámasztották az ödémamérési adatokat. A gyulladás hisztológiai jelei kifejezettebbek voltak a TRPV1 knockout állatoknál, az NK1 receptor hiánya csökkentette, míg a CGRP hiány nem befolyásolta a szövettani score-t

Neutrofil granulociták számának meghatározása, a myeloperoxidáz enzim spektrofotometriás mérésével: Homogenizálás és centrifugálás után a fülminták felülúszójából H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-3,3',5,5'-tetrametil benzidinnel meghatároztuk a myeloperoxidáz enzim mennyiségét. Az enzim mennyiség korrelál az akkumulálódott leukociták számával.

A myeloperoxidase tartalom alapján nem volt különbség a knockout egerek értékei és a vad kontrollok között.

CBA (Cytometric bead array): A lokális citokin profil változását egy egér Th1/Th2 kit segítségével CBA módszerrel határoztuk meg. Vizsgáltuk az IL-2, IL-4, IL-5, TNF $\alpha$ , és IFN $\gamma$  mennyiségi változásait 24 és 48 óra után. Az IL-2 szint meglepetésre nem mutatott növekedést egyik csoportban sem. A TNF $\alpha$  tartalom viszont magas volt oxazonon kezelés hatására az összes kontroll csoportban és ezekhez képest is jelentős növekedést mutatott a TRPV1 KO állatokban 24 óra után, viszont szignifikánsan csökkent az NK1 receptor KO és a CGRP KO állatok a 48 órás mintáiban. Az IL-4 szintén emelkedett volt 24 óra után, főleg a BALB/c állatokban. Az RTX előkezelés csökkentette az összes mért citokin mennyiségét..

Eredményeink azt mutatják, hogy a capsaicin érzékeny neuronokból felszabaduló szenzoros neuropeptidok eredő hatása gátlás a DTH-ra. A Substance P az NK<sub>1</sub> receptoron, a CGRP pedig saját receptorán hatva fokozza az ödémát.

Kísérleteinkkel igazoltuk a TRPV1 receptor protektív hatását az allergiás kontakt dermatitisz kifejlődésére. (*Bánvölgyi és mtsai. J. Neuroimmunol. 2005.*)

Mivel a TRPV1 receptorgén hiányos egerekben a dermatitisz súlyosabb volt, feltételeztük, hogy a TRPV1 aktiváció hatására gyulladásgátló vegyület szabadul fel. Korábbi vizsgálataink szerint, a feltételezett gyulladásgátló peptid a szomatosztatin, ezért megvizsgáltuk az oxazonon dermatitiszt szomatosztatin 4 receptorgén (sst4) hiányos egerekben. Vizsgáltuk az ödémát, az akkumulálódott leukociták számát, a szövettani képet és a lokális citokin profilt. Megállapítottuk, hogy az oxazonon 80-100%-os fülvastagság növekedést okozott 24-48 h alatt a vad típusú egerekben, ami sst4 KO állatokban 180-200%-ra nőtt. A hisztológiai elemzés fokozott sejtakkumulációt mutatott a knockout egerekben, a TNF-alfa citokin mennyisége pedig szignifikánsan megemelkedett. Eredményeink alapján arra következtetünk, hogy az a

szomatostatin endogén gyulladásgátló peptidként viselkedik az allergiás kontakt dermatitisz kialakulása során, az sst4 receptorokon keresztül hatva.

2. A TRPV1 receptorok és a CGRP szerepét vizsgáltuk bleomycinnel indukált szkleroderma modellben. A lokális bleomycin kezelés jelentős bőrmegvastagodást és fibrózist okozott egerek hátbőrében a foszfát pufferral kezelt kontrollhoz képest. Az összetett szklerózis pontszám 18%-kal, a bőrvastagság 19%-kal, az alfa-SMA-pozitív sejtek száma 47%-kal, a hydroxyprolin tartalom 57%-kal nagyobb volt a TRPV1 KO állatokban, mint a vad típusú kontrollokban. Hasonlóan a szklerózis pontszám 47%-kal, a bőrvastagság 29%-kal, az alfa-SMA-pozitív sejtek száma 76%-kal, a hydroxyprolin tartalom 30%-kal nagyobb volt a CGRP KO, mint a vad egerekben. Az eredmények azt mutatják, hogy a TRPV1 receptor aktivációja olyan neuropeptidek felszabadulását okozza, melyek gátolják a fibrózist. A CGRP protektív szerepét bizonyítottuk a fibrózis kialakulásában. (*Szabó és mtsai. Arthritis and Rheumatism, 2008*)

3. Megállapítottuk, hogy a phorbol-myristat-észter (PMA) okozta lokális fülgyulladás szenzibilizálja az érzőideg-végződéseket az ellenoldali fülben. A szenzibilizált fülben megnő a lokális IL-1 $\beta$  szintje és a különben inert oldószer, az aceton neurogén ödémát okoz. A szenzibilizációt COX-gátló ibuprofen kivédi. Feltételezzük, hogy az IL-1 $\beta$  és a prosztanoidok fontos szerepet játszanak az ellenoldali érzőideg-végződések érzékenyítésében. (*Pozsgai és mtsai. Inflammation Research, 2007*).

4. A Pharmacology and Therapeutics folyóirat felkérésére elkészítettük az “*Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception*” összefoglaló tanulmányt. (*Pintér és mtsai. Pharmacology and Therapeutics, 2006*.)