

ÚJ FÁJDALOM- ÉS GYULLADÁSCSÖKKENTŐ TERÁPIÁS LEHETŐSÉGEK *IN VIVO* ÁLLATKÍSÉRLETES VIZSGÁLATA

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS



Sándor Katalin

Elméleti Orvostudományok - Neurofarmakológia Program
Programvezető: Dr. Szolcsányi János
Témavezető: Dr. Helyes Zsuzsanna

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
FARMAKOLÓGIAI ÉS FARMAKOTERÁPIAI INTÉZET

2008

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	3
BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS, A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI.....	4
CÉLKITŰZÉSEK	14
I. FEJEZET: A SZOMATOSZTATIN SST₄ RECEPTORON SZELEKTÍVEN HATÓ AGONISTA J-2156 ANALGETIKUS HATÁSA AKUT ÉS KRÓNIKUS GYULLADÁS- ÉS FÁJDALOMMODELLEKBEN.....	15
1. BEVEZETÉS	16
2. KÍSÉRLETI MODELLEK, VIZSGÁLATI MÓDSZEREK.....	19
3. EREDMÉNYEK	26
4. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK.....	34
II. FEJEZET: A HIPOFÍZIS ADENILÁT CIKLÁZ-AKTIVÁLÓ POLIPEPTID (PACAP-38) ELTÉRŐ PERIFÉRIÁS HATÁSAI PATKÁNY ÉS EGÉR FÁJDALOMMODELLEKBEN	36
1. BEVEZETÉS	37
2. KÍSÉRLETI MODELLEK, VIZSGÁLATI MÓDSZEREK.....	39
3. EREDMÉNYEK	44
4. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK.....	49
III. FEJEZET: A SZTATIKUS MÁGNESES TÉR ANTINOCICEPTÍV HATÁSA ÉS A HÁTTÉRBE ÁLLÓ MECHANIZMUSOK VIZSGÁLATA	53
1. BEVEZETÉS	54
2. KÍSÉRLETI MODELLEK, VIZSGÁLATI MÓDSZEREK.....	56
3. EREDMÉNYEK	59
4. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK.....	64
ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA.....	66
IRODALOMJEGYZÉK.....	68
AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK.....	78
EGYÉB EREDETI KÖZLEMÉNYEK.....	79
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	80

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

12-HPETE: 12-hidroperoxi-eikozatetraénsav
AEA: N-arachidonoil-etanolamin (anandamid)
ATP: adenzin-trifoszfát
BSA: bovine serum albumin, borjú szérum albumin
cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát
CFA: complete Freund's adjuvant, komplett Freund-adjuváns
CGRP: kalcitonin gén-rokon peptid
CRLR: calcitonin receptor-like receptor, kalcitonin receptorszerű receptor
ECAC: epithelial Ca²⁺ channel, epiteliális Ca²⁺-csatorna
GH: growth hormone, növekedési hormon
IL: interleukin
IFN- γ : interferon γ
IP₃: inozitol-triszfoszfát
KO: knock out, génhányos
LPS: lipopoliszacharid
MAPK: mitogén-aktivált protein kináz
NADA: N-arachidonoil-dopamin
NdFeB: neodímium-vas-bór ötvözet
NK: neurokinin
NMDA: N-metil-D-aszpartát
NO: nitrogén-monoxid
PAC1: PACAP receptora
PACAP: pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, hipofízis adenilát cikláz-aktiváló polipeptid
PK: protein kináz
PMA: forbol-12-mirisztát-13-acetát
RAMP: receptor activation modifier protein, receptor aktiválást módosító fehérje
RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute-ban kifejlesztett tápoldat
RTX: reziniferatoxin
oSMF: optimized static magnetic field, optimalizált sztatikus mágneses mező
SP: substance P, P-anyag
SRIF: somatotropine release inhibitory factor, szomatotropin felszabadulást gátló hormon
SST: szomatosztatin
TNF α : tumor nekrozis faktor α
TRPV1: tranziens receptor potenciál vanilloid 1
TRPA1: tranziens receptor potenciál ankirin 1
VIP: vazoaktív intesztinális peptid
VPAC: VIP és PACAP közös receptora
VR1: vanilloid receptor 1
VRL: vanilloid-like receptor, vanilloidszerű receptor

BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS, A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI

A kapszaicin farmakológiai története

A kapszaicin a paprika (*Capsicum annuum*) csípős anyaga. Kémiai szerkezetét tekintve 8-metil-N-vanillil-transz-6-nonénamid, vagyis alkaloid típusú vegyület. A népi gyógyászatban már évszázadok óta használják ízületi betegségek kezelésére, illetve fájdalomcsillapításra. A kapszaicines kenőcsök, illetve tapaszok enyhíthetik a hátfájást, csillapíthatják a reumás ízületi gyulladás és a szenzoros neuropátia tüneteit.

Az első experimentális adatokat a kapszaicin hatásáról 1878-ban közölte Hőgyes Endre. Eredményeiből már akkor arra következtetett, hogy a kapszaicin hatásait elsősorban a szenzoros idegek végződéseinek fejtik ki (Hőgyes 1878). A kapszaicint az orvosi gyakorlatban bedörzsölőszernek, ellenirritánsnak használták, ízületi gyulladások fájdalmas következményeinek csillapítására. Valós hatásmechanizmusát ekkor még nem ismerték. A további kutatások és azok eredményei ezt követően még 70 évet vártak magukra.

A következő dátum az 1940-es évek vége, amikor egy újabb magyar kutató, a szegedi Jancsó Miklós megfigyelte azt a jelenséget, hogy a piros paprika csípős anyagának nagy dózisa lokális, később szisztémás alkalmazása állatban (egérben, patkányban, tengerimalacon) az analgészia egy speciális formáját váltja ki. Az állatok nem mutattak nocifenzív reakciót semmilyen fájdalmas kémiai ingerre, mechanikai ingerekre azonban a reakciókészség továbbra is megmaradt. Jancsó tehát azt találta, hogy egy fájdalomkeltő, csípős anyag fájdalomcsillapító hatással rendelkezik (Jancsó 1960).

Jancsó korai halála után tanítványa, Szolcsányi János és felesége, Jancsó-Gábor Aranka folytatták a kapszicinnel kapcsolatos kutatásokat. Első, nemzetközileg is jegyzett, és azóta mintegy ezerszer idézett úttörő munkájuk 1967-ben jelent meg. Ebben leírták, hogy a patkány *nervus saphenus*-ának és *nervus trigeminus*-ának izgatása gyulladást okoz az állat bőrében, ami arteriolás vazodilatációt, a vaszkuláris permeabilitás növekedését, plazmaproteinek extravazációját eredményezi. Nagy dózisú kapszicinnel történő előkezelést (deszenzibilizáció) követően sem ortodrómos, sem antidrómos úton nem alakult ki gyulladás (Jancsó et al. 1967). E válaszok hiányának alapján feltételezték, hogy a mediátorok a kapszaicin-érzékeny fájdalomérző idegvégződésekből, nociceptorokból szabadulnak fel.

A kapszaicin, mint potenciális farmakológiai eszköz a perifériás idegrendszer kutatásában, elsősorban akkor került az érdeklődés középpontjába, amikor Jessell és munkatársai 1978-ban közölték, hogy a kapszaicin P-anyag kiáramlását okozza a primér szenzoros idegvégződésekből anélkül, hogy befolyásolná a peptid felszabadulását az enterális és központi idegrendszeri neuronokból (Jessell et al.

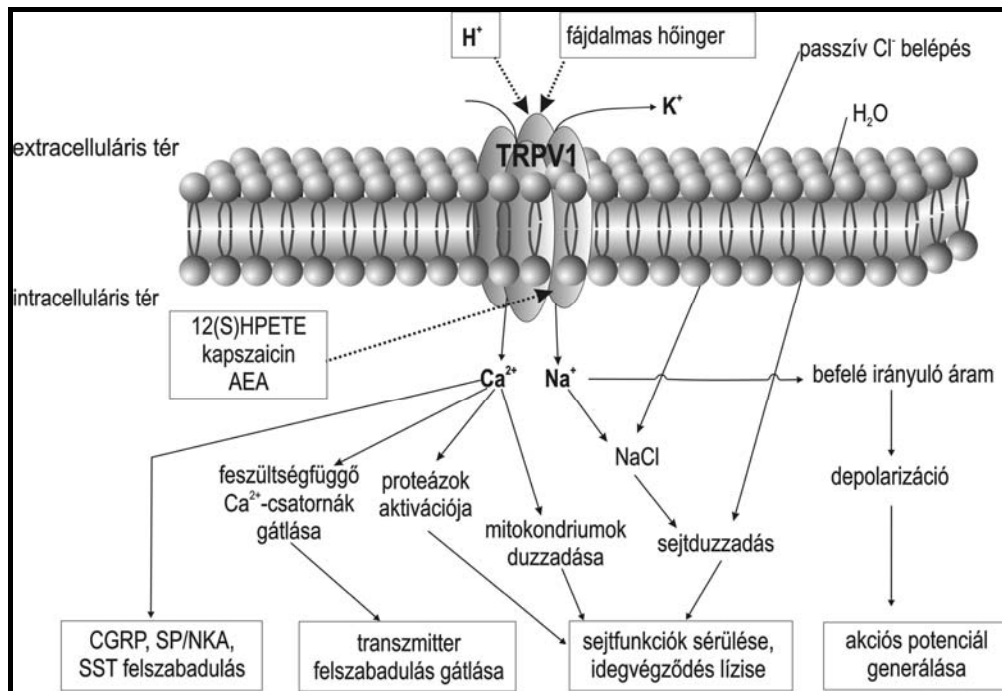
1978). Egy évvel később Lembeck és Holzer kimutatták, hogy a kapszaicin-érékeny idegvégződésekből felszabaduló P-anyag közvetíti a neurogén plazmaprotein-extravazációt (Lembeck & Holzer 1979). Az említett közlemények megjelenése után felélénkült az érdeklődés a szenzoros neuropeptidek és a kapszaicinre érzékeny szenzoros idegrendszer iránt is. Napjainkban számos kutatócsoport foglalkozik kapszaicinnal, receptorával és a velük kapcsolatba hozható neuropeptidekkel.

A kapszaicin receptor

A kapszaicin receptor létezésének lehetőségét először Szolcsányi János és Jancsó-Gábor Aranka vetették fel egy 1975-ös cikkben, amelyben kapszaicin és más vanilloid analógok nociceptív hatását vizsgálták patkányon. A vegyületek szerkezete és hatása között tapasztalt összefüggések alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a kapszaicinnek receptorális úton kell hatnia. A receptor hipotetikus modelljét is megszerkesztették ekkor (Szolcsányi & Jancsó-Gábor 1975, 1976). A kapszaicint expresszálo gén megtalálása és a receptor szerkezetének megismerése azonban több, mint 20 évig váratott még magára, bár 1990-ben patch clamp vizsgálatokkal sikerült bizonyítani, hogy a kapszaicin és a reziniferatoxin ugyanazt a kation-csatornát nyitja az érzőneuronok plazmamembránján (Bevan & Szolcsányi 1990). 1997-ben Julius és munkacsoportja klónozták a kapszaicin receptort, amit a szintén vanilloid struktúrát tartalmazó reziniferatoxinnal való aktiválhatósága miatt vanilloid 1 receptornak (VR1) neveztek el (Caterina et al. 1997). Ezt az elnevezést később a receptorok szerkezetén alapuló nemzetközi nomenklatúra szerint megváltoztatták, a receptort a tranziens receptor potenciál (TRP) nagycsaládba sorolták, és a vanilloid család 1-es számú tagjaként tranziens receptor potenciál vanilloid 1-nek (TRPV1) nevezték (Gunthorpe et al. 2002). Érdekes, hogy a TRPV család többi receptorára (TRPV2-6) nem hatnak olyan vanilloid struktúrájú vegyületek, mint a kapszaicin és reziniferatoxin, ezek ugyanis valójában csak vanilloid receptorszerű struktúrák és epiteliális Ca^{2+} -csatornák, melyeket a régebbi nomenklatúra rendre vanilloid receptor-like (VRL), illetve epithelial Ca^{2+} channel (ECAC) névvel illetett (Gunthorpe et al. 2002).

A később klónozott humán TRPV1 receptor 92%-os hasonlóságot mutat a patkány receptor szerkezetével (Hayes et al. 2000; McIntyre et al. 2001). Ez a receptor 838 aminosavból álló fehérje, amit 6 β -redő szerkezetű transzmembrán domén épít fel. A csatornarégiót az 5. és 6. alegység közötti intracelluláris, hidrofób hurok alkotja. Ezek a struktúrák a membránban négy egységből álló tetramerré rendeződve ioncsatornát alkotnak, amely kationokra nem szelektíven érzékeny (1.ábra). A receptor aktiválódásakor a sejtbe Na^{+} - és Ca^{2+} -ionok áramlanak be, melyet K^{+} -ion sejtéből való kiáramlása követ. A Na^{+} -ion főként az akciós potenciál generálásáért felelős, aminek folyományaképp a nocicepció, fájdalomérzet kialakul. A Ca^{2+} -ion beáramlása pedig elsősorban a szenzoros neuropeptidek idegvégződésekből való felszabadulásához vezet. Tartós vagy ismételt aktiváció hatására a sejtben

felhalmozódó kationok magas koncentrációi a citoplazma és a mitokondrium duzzadását okozzák, ennek hosszú távú következményeként a sejtek energiaforgalma csökken, az idegvégződés működésképtelenné válik. Ez a folyamat adja a molekuláris hátterét a nagy dózisu kapszaicinnal történő előkezelés hatására kialakuló deszenzitizációnak (1.ábra), melynek következtében az érzőidegvégzödések kémiai ingerekkel szemben érzéketlenné válnak anélkül, hogy fizikai ingerekkel szemben változna válaszkészségük (Bevan és Szolcsányi 1990; Szolcsányi 1993; Helyes et al. 2003).



1.ábra: A receptor működésének vázlata

A TRPV1 polimodális szenzor funkciójú ioncsatorna, tehát többféle módon, fizikai vagy kémiai ingerekkel aktiválható intra- és extracellulárisan is. A TRPV1 fájdalmas, 43°C feletti hőingerrel (Tominaga et al. 1998), valamint pH 6 alatti proton-koncentrációval aktiválható. Számos növényi eredetű vanilloid, a kapszaicinon kívül például a mexikói kutyatejféliben (*Euphorbia resinifera*) található reziniferatoxin (RTX), a borsban (*Piper nigrum*) lévő piperin, a gyömbérben (*Zingiber officinale*) előforduló zingeron képes nyitni az ioncsatornát. Érdekes módon a kapszaicin, lipofil jellegéből adódóan, a sejtmembránon átjutva intracellulárisan kötődik a receptorhoz, így aktiválva azt (Oh et al. 1996). Ezen kívül léteznek a receptornak endogén ligandjai is, például az endokannabinoid N-arachidonil-etanol-amin (AEA) vagy más néven anandamid (Caterina et al. 1997), a 12-hidroperoxi-eikozatetraénsav (12-HPETE), vagy az N-arachidonil-dopamin (NADA). Az is ismert, hogy a bradikinin, az egyik legerősebb fájdalomkeltő mediátor, a B₂ receptorokon hatva szenzitizálja a TRPV1-et az

intracellulárisan működő másodlagos messenger mechanizmusok révén, valamint a lipoxigenáz termékek szintézisének szabályozásával, foszfolipáz A₂ enzim aktiválásán keresztül (Piomelli et al. 2000; Shin et al. 2002). Emellett a csatorna működését jelentős mértékben fokozzák a prosztaglandinok, például a gyulladásos folyamatokban kulcsfontosságú prosztaglandin E₂, vagy a prosztaciklin néven ismert prosztaglandin I₂ (Szállási & Blumberg 1999; Chuang et al. 2001). A receptor potens, valódi endogén ligandja azonban egyelőre nem ismert.

A TRPV1 receptor nagy mennyiségben megtalálható a hátsó gyöki és trigeminális ganglionokban, specifikusan a kis és közepes átmérőjű szenzoros neuronokon (Caterina et al. 1997; Tominaga et al. 1998), vagyis főként a vékony mielinhüvelyes (A δ -) és a mielinhüvely nélküli (C-) rostokkal bíró neuronokon és végződésein fordul elő (Holzer 1991).

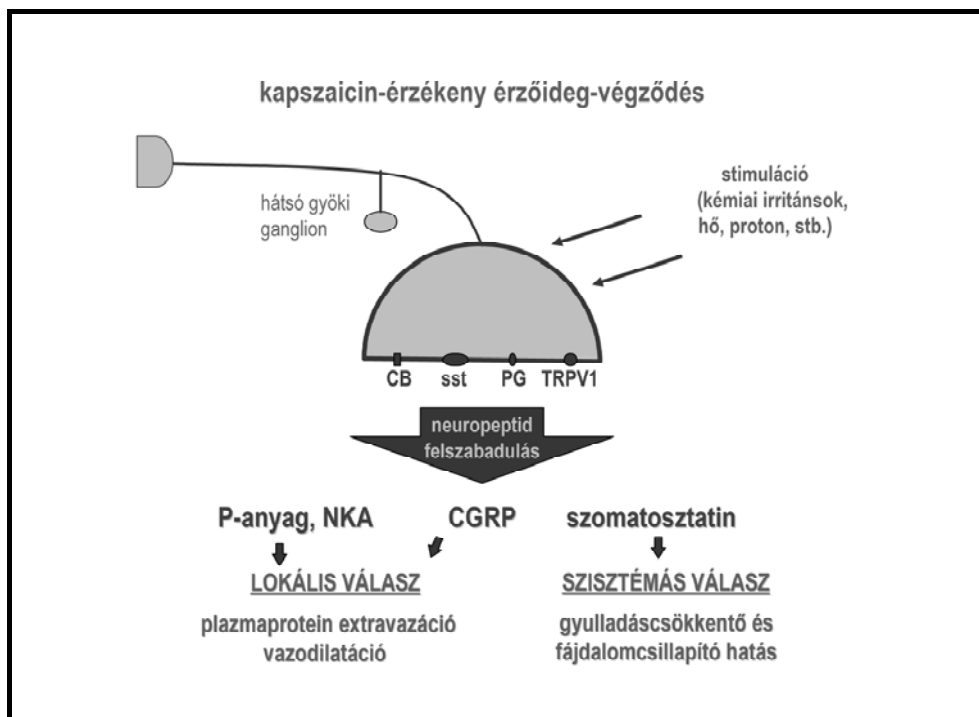
A receptor klónozása után a következő nagy lépés a kapszaicin történetében akkor következett be, amikor 2000-ben két kutatócsoport egymástól függetlenül sikerrel állított elő a TRPV1 receptorra nézve génhianyos, vagyis TRPV1 knockout, TRPV1^{-/-} egereket (Caterina et al. 2000; Davis et al. 2000). Ennek segítségével a TRPV1 receptor működését *in vivo* szelektíven lehet vizsgálni. Korábban a kapszaicin-érzékeny idegvégződések gyulladásos és fájdalom-kórképekben betöltött szerepének meghatározása kapszaicinnal vagy RTX-szel való deszenzitizálással történt. Ezzel a módszerrel ugyanakkor a teljes idegvégződés hosszú távú funkcióvesztése következik be (Bevan & Szolcsányi 1990; Szolcsányi 1993; Helyes et al. 2003).

A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződések hármas funkciója

A kapszaicinre érzékeny, TRPV1-et expresszáló érzőideg-végződések hármas funkcióval rendelkeznek: afferens, valamint lokális és szisztémás efferens funkciójuk is van (2.ábra). A klasszikus afferens működés során a kapszaicinnal vagy egyéb stimulánssal izgatott szenzoros idegvégződések a központi idegrendszer felé közvetítenek idegaktivitást, ennek következtében alakul ki a fájdalomérzet, a nocicepció. Emellett az aktivált perifériás idegvégződésből neurotranszmitterek szabadulnak fel, amelyek vazodilatációt, értágulatot okoznak. Ilyen mediátor a kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP), mely értágulatot vált ki, illetve a tachikininek, például a P-anyag (substance P, SP) vagy a neurokinin A (NKA), melyek plazmafehérje-kiáramlást idéznek elő és aktiválják a gyulladásos sejteket. Ez adja a lokális efferens funkciót (Szolcsányi 1984; Maggi & Meli 1988), aminek következtében kialakul a neurogén gyulladás (Szolcsányi 1988; Helyes et al. 2003). A neurogén gyulladásnak jelentős szerepet tulajdonítanak számos betegség patomechanizmusában, például a reumatoid arthritisz, asztma bronchiale, pszoriázis, ekcéma, kontakt dermatitisz, gyulladásos bélbetegségek és gyulladásos szembetegségek esetén (Maggi 1995; Szolcsányi 1996). Jelenleg nincs forgalomban egyetlen olyan

gyógyszercsoport készítménye sem, ami hatékonyan tudná gátolni egy gyulladással járó betegség neurogén komponensét (Helyes et al. 2003).

Az intézet kutatócsoportjának munkája során derült fény arra, hogy ugyanezen aktivált szenzoros idegvégződésekből az előzőekben felsorolt gyulladáskeltő neuropeptideken kívül szomatosztatin is felszabadul, amely a keringésbe jutva szisztémás gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatásokkal rendelkezik. Ez az érző idegvégzések harmadik, szisztémás efferens funkciója (Szolcsányi et al. 1998a,b; Helyes et al. 2000, 2004), amit az endokrin és parakrin hatás mintájára Szolcsányi professzor szenzokrin hatásnak nevezett el (Szolcsányi et al. 2004).



2.ábra: A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végzések hármas funkciója

Szenzoros neuropeptidek

1. Fájdalom- és gyulladáskeltő hatású neuropeptidek

A kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronokból stimulálás hatására felszabaduló neuropeptidek egyik csoportja a **tachikininek**. Ide sorolható a neurokinin A (NKA), a neurokinin B (NKB), és a P-anyag (SP). Élettani hatásukat G-proteinhez kapcsolt neurokinin receptorokon fejtik ki, amiket rendre NK₁, NK₂ és NK₃ receptor névvel illetünk. A P-anyag érpermeabilitást fokozó hatását az NK₁ receptoron keresztül fejt ki, ami főként a posztkapilláris venulák falán, makrofágok és limfociták membránján,

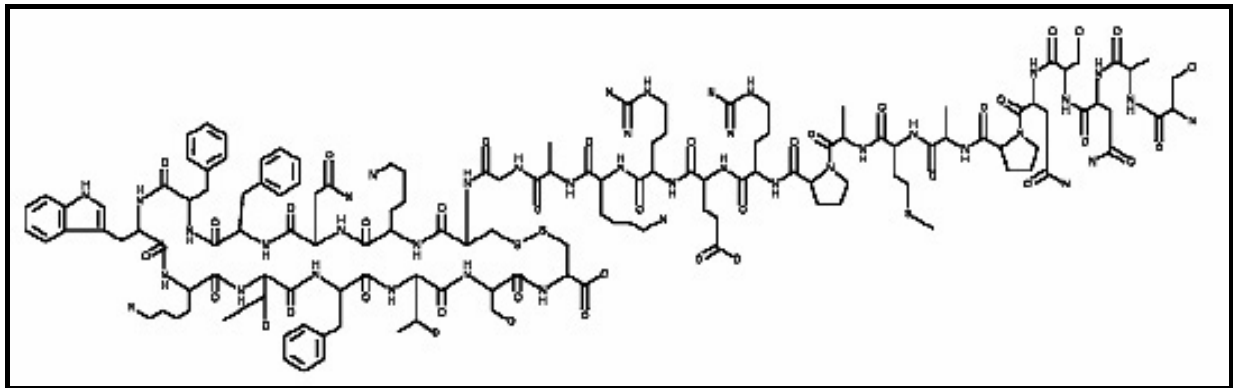
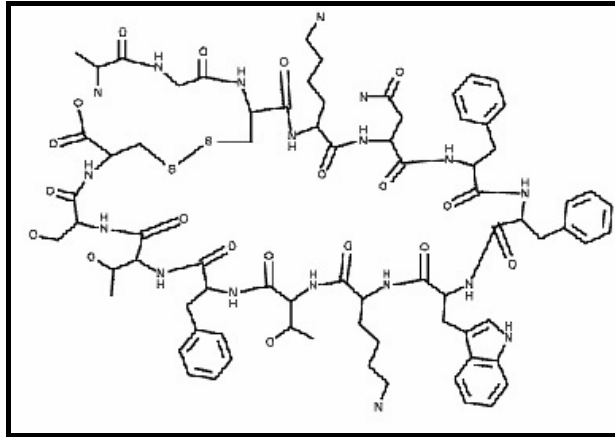
polimorfonukleáris sejteken, hízósejteken található meg (Regoli et al. 1994; Cao et al. 1999; Patacchini & Maggi 2001). Ezekből adódóan plazmaprotein-kiáramlást vált ki és hatással van a limfociták proliferációjára, a hízósejtek aktivációjára, T-sejt kemotaxisra, a neutrofil granulociták akkumulációjára is (Grant 2002). Az NKA főként simaizom kontrakciót vált ki, erőteljes plazmafehérje-kiáramlást idéz elő, valamint gyulladássos sejteket – neutrofil granulocitákat, limfocitákat, makrofágokat - stimulál az NK₂ receptoron keresztül (de Swert & Joos 2006) főként a periférián, de a központi idegrendszerben is. Az NKB-t megkötő NK₃ receptor pedig főként a központi idegrendszerben, valamint perifériás idegvégződéseken fordul elő (Frossard & Advenier 1991; Massi et al. 2000).

A 37 aminosavból álló **kalcitonin gén-rokon peptid** (CGRP) felfedezése Amara és munkatársai nevéhez fűződik (Amara et al. 1982). Egymástól kevésbé eltérő két formája az α CGRP és a β CGRP, melyek biológiai hatásait a CGRP₁ és CGRP₂ receptorokon fejtik ki (van Rossum et al. 1997). A receptor szerkezetileg egy CRLR egységből (calcitonin receptorszerű receptor) és egy RAMP-1 egységből (receptor-aktiválást módosító fehérje 1) épül fel (Njuki et al. 1993; McLatchie et al. 1998). A receptor G_s-fehérjéhez kapcsolatosan működik. A CGRP egy családba sorolható a kalcitoninnal, az amilinnal és az adrenomedullinnal (Poyner et al. 2002). Erős vazodilatátor hatással rendelkezik, ami főképp a CGRP₁ receptoron keresztül valósul meg. A CGRP fokozza ugyanis az adenilát-cikláz aktivitást, aminek következtében intracellulárisan megnő a cAMP mennyisége, ami aktiválja a protein kináz A-t, aminek hatására megnyílnak az ATP-függő K⁺-csatornák. A folyamat eredménye az érsimaizom relaxációja (Edvinsson et al. 1985; Han et al. 1990; Hughes & Brain 1994). Neurogén gyulladásban az érpermeabilitás fokozását azonban nem közvetlenül, hanem a P-anyag működésének befolyásolásával fejt ki (Cao et al. 2000). Emellett komplex immunmodulátor funkciója van, csökkenti a proinflammatorikus citokinek termelődését, fokozza az antinociceptív interleukin-10 (IL-10) felszabadulását makrofágból, stimulálja a granulocita akkumulációt (Barnes 2001).

2. Fájdalom- és gyulladásgátló hatású neuropeptidok

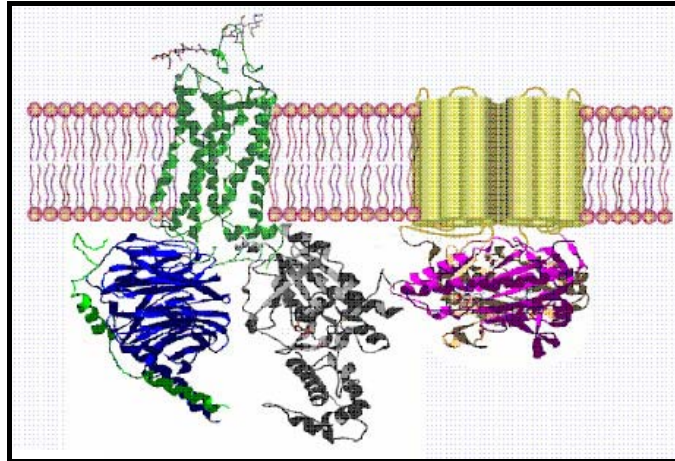
A **szomatosztatin**, vagy más néven szomatotropin (growth hormone, GH) felszabadulását gátló faktor (somatotropine release inhibitory factor, SRIF), 14 illetve 28 aminosavból álló ciklikus peptid (3.ábra) formában fordul elő a szervezetben (Brazeau 1986). Megtalálható a központi és a perifériás idegrendszerben (Parsons et al. 1976; Reichlin 1983), a gasztrointesztinális traktusban, a hasnyálmirigyben, a vesében, a mellékvesében, a pajzsmirigyben, gyulladássos sejtekben, ivarszervekben (Hofland & Lamberts 1996; Reubi et al. 1999; ten Bokum et al. 2000). A szomatosztatin gátló hatást gyakorol számos endokrin hormon (például glukagon, inzulin, gasztrin, prolaktin, szekretin)

szekréciójára, a gasztrointesztinális motilitásra, az emésztőnedv termelésére, tumorsejtek proliferációjára. Szerepet játszik továbbá kognitív funkciókban, jelentőségét számos pszichiátriai és neurológiai kórképben igazolták (Vécsei & Widerlöv 1988).



3.ábra: A szomatosztatin-14 és szomatosztatin-28 szerkezete

Élettani hatásait saját receptoraihoz kötve fejt ki (4.ábra). Eddig öt G_i -proteinhez kapcsolt szomatosztatin receptor altípust klónoztak egérben, patkányban, illetve emberben, amiket rendre sst_1 , sst_2 , sst_3 , sst_4 és sst_5 névvel illették (Patel et al. 1995). Ezt az öt sst receptor altípust két csoportra lehet osztani, szintetikus szomatosztatin analóg-kötő képességük alapján. A SRIF1 csoportba tartoznak az sst_2 , sst_3 és sst_5 receptorok, amelyek nagy affinitással kötnek analógokat, míg a SRIF2 csoportba soroljuk az sst_1 és sst_4 receptorokat, amelyek alacsony analóg-kötő affinitással rendelkeznek (Hoyer et al. 1995; Pintér et al. 2006). Az irodalom szerint az endokrin hatást a SRIF1 csoportba tartozó receptor altípusok közvetítik (Raynor & Reisine 1992). Elsősorban munkacsoportunk eredményei azt mutatják, hogy a fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatás a másik csoportba, vagyis az sst_1 és sst_4 receptorokhoz köthető (Helyes et al. 2001; Pintér et al. 2002; Szolcsányi et al. 2004; Pintér et al. 2006).



4.ábra: A szomatosztatin receptor sematikus szerkezete

Bár a receptor altípusok klónozása elősegítette a szomatosztatin fiziológiai szerepével kapcsolatos kutatásokat, nagy előrelépést újfent a receptor génhányos egerek előállítását jelentett. Intézetünkben tavaly óta végzünk kísérleteket *sst₄ KO (sst₄^{-/-})* egerekkel, amiket Dr. Piers Emson (Laboratory of Molecular Neuroscience, Babraham Institute, Cambridge, UK) nagylelkű felajánlásával kaptunk és tenyésztünk az intézet állatházában azóta is.

A hipofízis adenilát cikláz-aktiváló polipeptidet, a **PACAP**-ot (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) eredetileg birka hipotalamuszából izolálták (Miyata et al. 1989). A szekretin-glukagon-vazoaktív intesztinális peptid (VIP) család tagja, ugyanis háromdimenziós vizsgálatok kimutatták, hogy alapvető szerkezeti rokonságot mutat a család többi tagjával (Segre & Goldring 1993; Wray et al. 1993). A legszorosabb, 68%-os egyezést a VIP szerkezetével mutat a PACAP, adenilát cikláz aktiváló hatása azonban legalább 1000-szer erősebb a VIP-énél (Gottschall et al. 1990; Sherwood et al. 2000). Két formája létezik: a szervezetben 90%-ban előforduló 38 aminosavból álló PACAP-38, és a 27 aminosavból álló PACAP-27. Patkányban a legnagyobb koncentrációban a hipotalamuszban és a herében fordul elő (Arimura et al. 1991), megtalálható ugyanakkor a központi idegrendszer többi területén és a perifériás idegrendszerben is, a hátsó gyöki ganglionok egyes szenzoros neuronjain (Mulder et al. 1994; Dun et al. 1996; Parsons et al. 2000). Expresszálódik továbbá endokrin mirigyekben (Vigh et al. 1993; Mikkelsen et al. 1995), az ivarszervekben (Shioda et al. 1994, 1996), a gasztrointesztinális traktusban (Hannibal et al. 1998), a légzőrendszerben (Moller et al. 1993), a bőrön (Odum et al. 1998). A PACAP rendkívül sokrétű feladatot lát el a szervezetben, szabályozza a neurotranszmitterek felszabadulását (May et al. 2000), értágulatot, illetve bronchodilatációt okoz,

fokozza a bélmotilitást, növeli egyes hormonok koncentrációját a vérben (Hamelink et al. 2002), szabályozza a sejtproliferációt, az apoptózist gátolja (Vaudry et al. 2002).

Fiziológiai hatásait speciális receptorokhoz kötődve fejti ki. Két kötőhely típust mutattak ki PACAP- és VIP-kötő képességük alapján. Az I-es típusú kötőhelyhez a PACAP mindkét formája nagy affinitással kötődik, a VIP viszont csak alig (Gottschall et al. 1990; Lam et al. 1990; Suda et al. 1992). A II-es típusú kötőhelyhez a PACAP és a vazóaktív intesztinális peptid is hasonló affinitással kötődik, ezen belül viszont két altípust is elkülönítenek, a szekretinhez való affinitás szerint (Tatsuno et al. 1990; Vaudry et al. 2000). A receptorokat később a kötőhelyek szerkezete alapján klónozták és rendre PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptornak nevezték el (Harmar et al. 1998).

Nocicepció, hiperalgéria, allodinia, fájdalom

A Nemzetközi Fájdalom Társaság meghatározása szerint a nociceptív fájdalom olyan pszicho-fiziológiai jelenség, szubjektív érzéskvalitás, amelynek két jól definiálható komponense különíthető el. Neurobiológiai eleme a nocicepció (a fájdalmas stimulus percepciója, szenzoros tapasztalat), ami állatkísérletesen is vizsgálható, míg az affektív komponens (a fájdalom emocionális megélése) megítélésére csak az ember képes. A különféle állatkísérletes modellekben vizsgálható nocicepció mechanikai (érintési), termális (hővel kiváltott) vagy kémiai (kapszaicin, formalin, ecetsav, stb.) ingerek hatására keletkezik. Az interoceptív területekről (zsigerekből, savós hártályból) eredő viscerális fájdalom vizsgálatára alkalmas egérben az ecetsavval, magnézium-szulfáttal vagy fenilkinonnal kiváltott vonaglasi teszt. Az exteroceptív régiókból (bőr, izom) származó szomatikus fájdalom például egérben és patkányban is a formalin teszttel vizsgálható. Az alapvetően nem fájdalmas stimulus hatására kialakuló érzékenység-fokozódást allodiniának, míg az enyhe fájdalmat kiváltó inger hatására fokozódó fájdalomérzetet hiperalgériának nevezzük. Mechanikai vagy termális allodinia és hiperalgéria is jelentkezhet gyulladás vagy különféle eredetű (traumás, toxikus) centrális/perifériás idegi sérülés következtében, amely a szomato-szenzoros, illetve a spino-talamo-kortikális pályarendszer bármely szintjén kialakulhat (Tajti & Vécsei 2006). A perifériás idegsérülésből, illetve működéscsökkenésből adódó traumás neuropátiás fájdalom kísérletesen a nervus ischiadicus részleges szoros lekötésével (Seltzer et al. 1990), az egész ideg laza lekötésével (Bennett 1993) vagy az L5 gerincvelői ideg lekötésével (Kim & Chung 1992) modellezhető.

Új fájdalomcsillapító-gyulladáscsökkentő gyógyszerek kifejlesztésének szükségessége

Új fájdalomcsillapító gyógyszerek kifejlesztésének preklinikai fázisában a vegyületek hatásának, hatásosságának meghatározása tehát nem könnyű feladat, mivel kizárólag a nocicepció vizsgálata lehetséges a nemzetközi irodalomban elfogadott állatmodellekben és vizsgálati módszerekkel. A

neuropátiás fájdalom egyetlen forgalomban lévő gyógyszer csoporttal (antiepileptikumok, opiátok, antidepresszánsok, lidokain) sem kezelhető kielégítő módon. Jellemző, hogy összehasonlítási értéknek azt a számot használják (number needed to treat: NNT), mely megadja, hogy hány beteget kell kezelni ahhoz, hogy az elsőben 50%-os fájdalomcsillapítás jöjjön létre (Tajti & Vécsei 2006). A több száz éve ismert és széles körben használatos klasszikus nem-szteroid gyulladáscsökkentők, fájdalomcsillapítók, amelyek mind a ciklooxygenáz enzimet gátolják, így a prosztaglandin szintézist csökkentik, a neuropátiás fájdalmat és a gyulladás neurogén komponensét nem csökkentik. Az opioid származékok, amelyek áttörést jelentettek a tumoros fájdalom csillapításában, ugyancsak alig hatnak neuropátiás állapotokban. A szteroidok nagy dózisban gátolják ugyan a neurogén gyulladást, de sokféle, súlyos mellékhatásuk (gasztrointesztinális vérzések, fekély, cukorbetegség, elhízás, stb.) miatt hosszabb távon nem lehet őket alkalmazni. Nagy szükség van ezért alapvetően új hatásmechanizmusú, elsősorban közvetlenül az érzőideg-végződések szintjén ható fájdalomcsillapítók, gyulladáscsökkentők kifejlesztésére. Ennek érdekében számos nocicepció modellt állítottunk be munkacsoportunkban, és vizsgálati módszerek széles skáláját sajátítottam el PhD-munkám során.

Jelen kísérletsorozatunkban olyan ígéretes célmolekulákat szeretnénk azonosítani, amelyek reményeink szerint új hatásmechanizmusú gyógyszerek kifejlesztésére nyújthatnak lehetőséget. Ezen vizsgálatok kapcsán sikerült feltárni, hogy antinociceptív/gyulladásgátló hatást kiváltó szomatosztatin fel tud szabadulni a kapszaicinre érzékeny érzőideg-végződésekől olyan minimális ingerek esetében is, melyek még szenzoros választ sem váltanak ki. A gerincvelői idegek 0.1 Hz-es antidrómos ingerlése például már maximális szisztémás gyulladásgátló hatást és plazma szomatosztatin-szint emelkedést eredményez, bár a nociceptorok ilyen frekvenciájú aktivitása még nem vált ki érzetet (Szolcsányi et al. 2004). A fentiek alapján érdekesnek látszott megvizsgálni, hogy olyan fizikai behatás, nevezetesen megfelelő erősségű sztatikus mágneses tér, mely előzetes kísérletek alapján fájdalomcsillapító hatást tud előidézni, állatkísérletesen is képes-e antinociceptív hatást kiváltani, és ha igen, akkor a hatásban milyen szerepet játszanak kapszaicinre érzékeny idegelemek.

CÉLKITŰZÉSEK

PhD-munkám során a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződésekből felszabaduló peptid mediátorok neurohumorális „szenzokrin” gyulladásgátló és antinociceptív hatásainak mechanizmusát és receptorális hátterét, illetve fizikai úton történő aktiválhatóságát vizsgáltam állatkísérletes modellekben, három konkrét kérdésfelvetés kapcsán.

I. Célunk volt a szomatosztatin 4 receptor ($ss4$) szerepének vizsgálata különböző *in vivo* gyulladás- és fájdalommodellekben. Az $ss4$ receptorra szelektíven ható agonistával, a J-2156 kódjelű nem-peptid szerkezetű vegyülettel végeztünk kísérleteket akut és krónikus kísérleti elrendezésekben, patkányban és egérben. Ezen vizsgálatok kapcsán módszertani feladatom volt olyan *in vitro* sejtenyésztési módszer kidolgozása az irodalmi adatok alapján, amely alkalmas izolált peritoneális makrofágok citokin termelésére ható vegyületek rutinvizsgálatára.

II. A PACAP-38 kimutatható a kapszaicinre érzékeny szenzoros neuronokban, és előzetes vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a perifériás végződésekből stimuláció hatására felszabadul. A nocicepcióban betöltött szerepére vonatkozóan a rendelkezésre álló ellentmondásos irodalmi adatok kizárólag a központi idegrendszerre fókuszálnak. Ebből kiindulva jelen kísérleteinkben a PACAP-38 perifériás hatásait vizsgáltuk különféle nocicepció modellekben.

III. Több állatkísérletes modellben vizsgáltam egy optimalizált paraméterekkel rendelkező sztatikus mágneses teret biztosító készülék segítségével, hogy ez a fizikai behatás kivált-e mérhető antinociceptív hatásokat. Vizsgáltam azt is, hogy a jelenségben lehet-e potenciális szerepe a kapszaicin-érzékeny peptiderg idegvégzéseknek.

I. FEJEZET

A SZOMATOSZTATIN SST₄ RECEPTORON SZELEKTÍVEN HATÓ AGONISTA J-2156 ANALGETIKUS HATÁSA AKUT ÉS KRÓNIKUS GYULLADÁS- ÉS FÁJDALOMMODELLEKBEN

A fejezet alapjául szolgáló közlemények:

K Sándor, K Elekes, Á Szabó, E Pintér, M Engström, S Würster, J Szolcsányi, Zs Helyes: **Analgesic effects of the somatostatin sst₄ receptor selective agonist J-2156 in acute and chronic pain models.**

European Journal of Pharmacology 539(1-2): 71-75. 2006

Zs Helyes, E Pintér, J Németh, K Sándor, K Elekes, Á Szabó, G Pozsgai, D Keszthelyi, L Kereskai, M Engström, S Würster, J Szolcsányi: **Effects of the somatostatin receptor subtype 4 selective agonist J-2156 on sensory neuropeptide release and inflammatory reactions in rodents.**

British Journal of Pharmacology 149: 405-415. 2006

K Elekes, Zs Helyes, L Kereskai, K Sándor, E Pintér, G Pozsgai, V Tékus, Á Bánvölgyi, J Németh, T Szűts, Gy Kéri, J Szolcsányi: **Inhibitory effects of synthetic somatostatin receptor subtype 4 agonists on acute and chronic airway inflammation and hyperreactivity in the mouse.**

European Journal of Pharmacology 578(2-3): 313-322. 2008

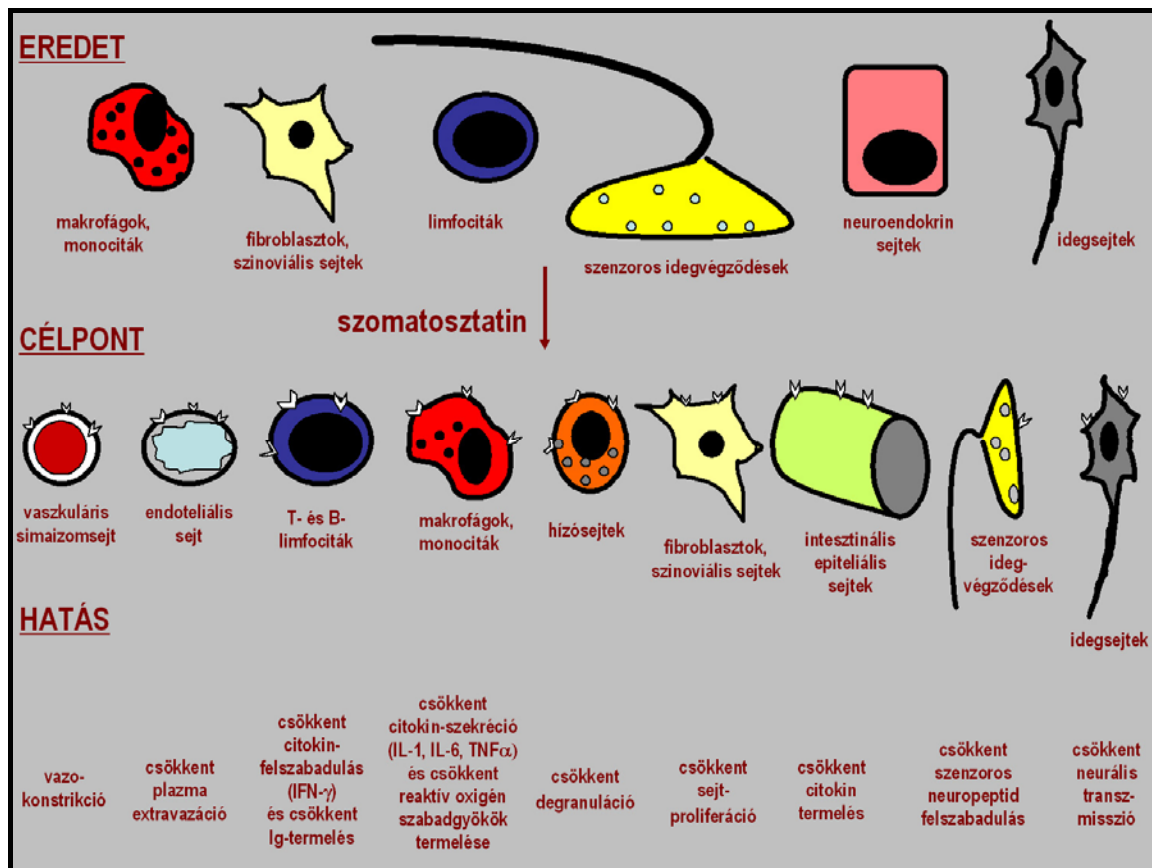
(ez a közlemény nagyrészt Elekes Krisztián PhD értekezésének alapját képezte, az itt ismertetésre kerülő *in vitro* sejtenyésztes adatok kivételével)

1. BEVEZETÉS

A szomatosztatin az idegelemek közül elsősorban a kapszaicin-érzékeny, TRPV1 receptort expresszáló szenzoros neuronokban szintetizálódik és tárolódik. Számos kísérletben, állatkísérletes modellben és különböző fájdalomkórképekben kimutatták, hogy a kívülről beadott szomatosztatin csökkenti a fájdalmat (Lembeck et al. 1982; Chrubasik 1991; Karalis et al. 1994; Fioravanti et al. 1995). Munkacsoportunk számos bizonyítékot szolgáltatott már arra, hogy a kapszaicin-érzékeny rostok aktiválását követően az idegvégződésekből felszabaduló szomatosztatin a keringésbe jut, ahol szisztémás gyulladáscsökkentő és antinociceptív hatást fejt ki, főként az sst₄ receptor altípuson keresztül (Szolcsányi et al. 1998a, b; Than et al. 2000; Helyes et al. 2000, 2001, 2004). Ezt az endogén ellenregulációs folyamatot Szolcsányi professzor szenzokrin működésnek nevezte, hogy elkülönítse a szenzoros rostokból származó szomatosztatin e funkcióját az egyéb eredetű szomatosztatin szerteágazó endokrin és parakrin hatásaitól (Than et al. 2000; Szolcsányi et al. 2004).

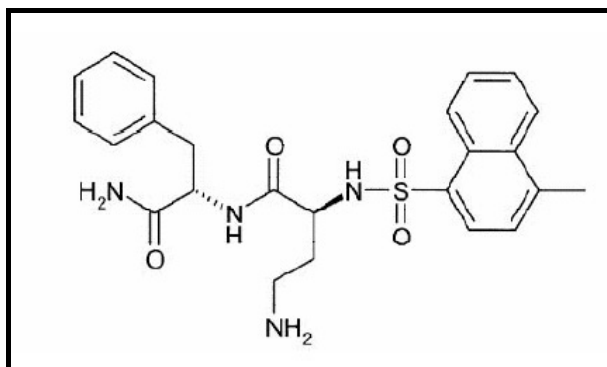
Az endogén szomatosztatin terápiás alkalmazását akadályozza annak rendkívül sokrétű előfordulása a szervezetben, széles hatásspektruma, és nagyon rövid (3 percnél kevesebb) plazma féléletideje (ten Bokum et al. 2000). Helyette viszont stabil, a szenzoros idegvégzések és számos gyulladáscsökkentő sejt sst₄ receptorain szelektíven ható szintetikus agonisták új terápiás lehetőséget nyújthatnak a gyulladáscsökkentésben és a fájdalomcsillapításban. Ezen agonisták nagy előnye, hogy nem rendelkeznek a szomatosztatin sst₂, sst₃ és sst₅ receptorai által közvetített endokrin hatásokkal.

A szomatosztatint neurális és nem-neurális eredetű sejtek is termelik: az idegelemekeken kívül neuroendokrin, gyulladáscsökkentő és immunsejtek. Ennek következtében hatása rendkívül sokféle lehet, függően attól, hogy melyik receptor-altípushoz kapcsolódik (Pintér et al. 2006). Az sst₄ receptort expresszáló célsejtek szintén lehetnek neurális és nem-neurális eredetűek. Az sst₄ aktiváció a központi idegrendszerben gátló hatást fejt ki a neuronális transzmisszióra, az érfali simaizom- és endotélsejteken vazokonstriktiót okoz, valamint csökkenti a plazmaproteinek extravazációját. Gátolja továbbá gyulladáscsökkentő és immunsejtek citokin - főként interleukin-1 és -6 (IL-1, IL-6), tumor nekrosis faktor α (TNF α), valamint interferon γ (IFN- γ) - termelését, az Ig-képződést, valamint a hízósejt degranulációt. A szenzoros idegvégzések csökkenti a fájdalom és gyulladás kialakulásáért felelős neuropeptidok felszabadulását (5.ábra) (Pintér et al. 2006).



5.ábra: A szomatosztatin eredete, gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatásának célpontjai és mechanizmusai (forrás: Pintér et al. 2006)

Sst₄/sst₁ receptor agonista molekula a ciklikus heptapeptid szerkezetű TT-232, amelynek széleskörű antinociceptív hatását számos korábbi kísérletünk igazolta (Helyes et al. 2000; Pintér et al. 2002; Helyes et al. 2004, 2005). Jelen kísérleteinket egy sst₄ receptor-altípushoz szelektíven, nagy affinitással kötő szomatosztatin agonistával, a J-2156 kódjelű vegülettel végeztük, amit a Juvantia Pharma (Turku, Finnország) gyárában szintetizáltak. A J-2156 nem peptid, szulfonamido-peptidomimetikum, pontos kémiai szerkezete (1'S,2S)-4-amino-N-(1'-karbamoil-2'-feniletil)-2-(4''-metil-1''-naftalénszulfonamino)-butánamid (6.ábra).



6.ábra: A J-2156 molekula szerkezete

Nagyságrendileg nanomoláris affinitással kötődik az emberi szomatosztatin sst_4 receptorhoz, ami a natív szomatosztatin kötődési affinitását is meghaladja, valamint közel 400-szoros szelektivitást mutat az sst_4 -hez az emberben megtalálható másik négy szomatosztatin receptor-altípushoz viszonyítva (Engström et al. 2005). A receptor-aktivációt jelző ciklikus AMP-tesztben a natív szomatosztatin-14-hez vagy szomatosztatin-28-hoz hasonlóan teljes agonistaként működött. Egy másik G-protein-aktivációs funkcionális tesztben 2.5-szer erősebb válaszokat adott, mint a natív szomatosztatin. Ezen tulajdonságai alapján e molekulát a „szuperagonista” jelzővel illették (Engström et al. 2005). További *in vitro* vizsgálatok igazolták, hogy a J-2156 kódjelű vegyület ismételt alkalmazása sem okoz deszenzibilizációt, ami tovább növeli e molekula terápiás alkalmazásának lehetőségeit (Engström et al. 2006).

Alábbi kísérletsorozatunkban a J-2156 antinociceptív és antiinflammatorikus hatásait vizsgáltuk különböző patkány- és egérmodellben.

2. KÍSÉRLETI MODELLEK, VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

Állatok

Kísérleteinket 20-25 g-os hím Balb/c egereken, 20-25 g-os nőtény CD1 egereken, valamint 200-250 g-os hím Wistar és Lewis patkányokon végeztük el, amelyeket a Pécsi Tudományegyetem Központi Állatházában tenyésztünk és tartottunk apatogén környezetben 24-25°C-on, normál étellel és vízzel *ad libitum* ellátva.

Kísérleteink minden esetben megfelelnek az állatkísérletek végzéséről szóló 243/1998. számú kormányrendelet előírásainak, és igazodnak a fájdalom tanulmányozására létrehozott nemzetközi tanács javaslataihoz (Zimmermann 1983). A kísérleti eljárásokat a Pécsi Tudományegyetem állatkísérletekkel foglalkozó Etikai Bizottsága engedélyezte (engedélyszám: BA 02/2000-16-2006).

Formalinnal kiváltott akut szomatikus kemonocifenzív viselkedés vizsgálata

Hím Balb/c egerek bal hátsó lábának talpi részébe 20 µl 2.5%-os formalin-oldatot injektáltunk, ami az állatban nocifenzív reakciót vált ki két fázisban. Az első fázis, ami 0-5. percig tart, valójában a formalin közvetlen kemonociceptív hatására jön létre. A második fázis, ami a 20. percben kezdődik és körülbelül a 45. percig tart, főként akut gyulladós reakciók következménye (Tjolsen et al. 1992). A nocicepciót a talpnyalogatással eltöltött idővel, másodpercben fejeztük ki mindkét fázisban.

A J-2156-ot a formalin-adás előtt 20 perccel intraperitoneálisan injektáltuk három különböző dózisban (1, 10 és 100 µg/kg).

A talp mechanociceptív küszöbének mérése traumás mononeuropátia modellben

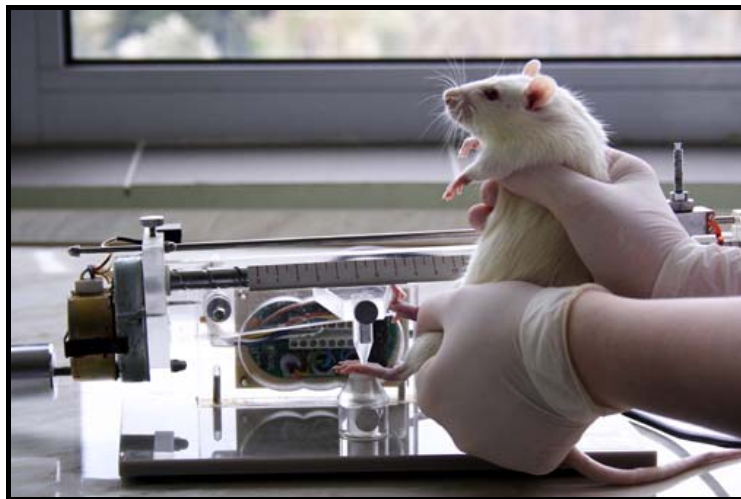
A nervus ischiadicus egyoldali részleges lekötése a végtag mechanociceptív küszöbének csökkenését idézi elő (Seltzer et al. 1990). Hím Wistar patkányokat Na-pentobarbitallal elaltattunk (Nembutal 50 mg/kg i.p.), az egyik oldali nervus ischiadicust a combon kipreparáltuk, majd az ideg 1/3-1/2-ed részét óvatosan elváasztottuk és 8-0-s atraumatikus szilikonos varróanyaggal szorosan leköttük, végül a sebet bezártuk. A műtétet követően az állatokat 7 napig hagytuk felépülni.

A Randall-Selitto-teszt méréseket Ugo Basile Analgesimeterrel (Olaszország) végeztük a műtét előtt és a műtétet követő 7. napon, ami kiválóan alkalmas a nervus ischiadicus részleges lekötéséből adódó mechanikai fájdalomküszöb-csökkenés (mechanikai hiperalgésia) meghatározására (Pintér et al. 2002).

A lazán kézben tartott állat hátsó lábát az analgesimeter tompahegyű plexikúpja alá helyezzük, majd a kúp segítségével a lábátat egyenletesen fokozódó erőhatásnak tesszük ki. Ha elérjük az állat

fájdalomküszöbét, vagyis amikor az állat kirántja a kúp alól a lábát, a műszer leáll, a küszöbértéket grammban a műszerről leolvassuk (7.ábra). A mért paramétereket a kezdeti értékekhez viszonyítva százalékban fejezzük ki.

A J-2156-ot három különböző dózisban (1, 10 és 100 µg/kg) adtuk intraperitoneálisan a mérés előtt 20 perccel.



7.ábra: Ugo Basile Analgesimeter

Freund-adjuvánssal kiváltott krónikus gyulladás vizsgálata

A krónikus ízületi gyulladást komplett Freund-adjuváns (CFA: complete Freund's adjuvant; 1 mg/ml hővel előlt *Mycobacterium tuberculosis* paraffinolajos szuszpenziója) faroktőbe, valamint intraplantárisan történő adásával (100-100 µl) váltottuk ki hím Lewis patkányokban. A szisztémás hatás fokozása érdekében a faroktőbe történő CFA-adást a következő napon megismételtük, ezt a napot tekintjük a kísérlet első napjának. A komplett adjuváns adásával a szervezet immunválasz-készsége stimulálható, a baktérium sejtfalában található muramil-dipeptid aktiválja a makrofágokat és a dendritikus sejteket, amely IL-12, IL-6, TNF α , IFN- γ fokozódó termeléséhez vezet. Ennek hatására poliklonális T-limfociták aktiválódnak, elsősorban T-helper1 (Th1, CD4+) irányba differenciálódnak és limfokineket termelnek. Az adjuváns alkalmazásának helyén a sajtos granulóma képződésért a makrofágok fokozott mértékű antigén-feldolgozása felelős, a krónikus poliarthritis kialakulásában CD4+ T-sejt klónok aktiválódása játszik szerepet (Joe & Wilder 1999; Billiau & Matthys 2001). Bár a CFA-adás oldalán súlyosabb ízületi gyulladás alakul ki, az ellenoldalon is megfigyelhetők az arthritisz paraméterei. Funkcionális méréseinket CFA adás előtt és azt követően 21 napon keresztül végeztük, a kísérlet végén a tibiotarzális ízületekből szövettani metszeteket készítettünk és morfológiai értékelés történt.

A J-2156 két dózist (1 és 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) napi háromszor injektáltuk intraperitoneálisan az állatoknak a teljes kísérleti periódus alatt.

A talp érintési érzékenységeinek mérése

A talp érintési érzékenységét Ugo Basile Dynamic Plantar Aesthesiometerrel (Olaszország) mértük. Ez valójában egy módosított, digitalizált von Frey-készülék, ahol az állat szabadon mozog egy alul rácsos plexiketrecben. Egy tükörrel ellátott stimulátoregység segítségével az állat talpának középső részét egy tompahegyű tűvel előre beállított paraméterek szerint fokozódó erőhatásnak tesszük ki. A maximális erőhatást 10 grammal határoztuk meg, az erőhatás növekedési dinamikáját 2 g/s értékre állítottuk be. A fájdalomküszöb elérésekor, vagyis amikor az állat elrántja a lábát a tompahegyű tűről, a számláló leáll, az erőhatást pedig a műszer kijelzőjéről grammal leolvashatjuk. A mért adatokat a kezdeti kontroll értékekhez viszonyítottuk, a gyulladás hatására kialakuló küszöbcsökkenést (allodinia) százalékban fejeztük ki (8.ábra).



8.ábra: Ugo Basile Dynamic Plantar Aesthesiometer

A lábduzzadás mérése

A lábtérfogat mérésére alkalmas műszerünk az Ugo Basile Plethysmometer (Olaszország), ami a közlekedőedények elve alapján működik. Az állat hátsó lábát előre meghatározott jellegű ehhez a műszerhez tartozó folyadékkal teli hengerbe merítjük. Ehhez a hengerhez csatlakozik egy másik, folyadékkal teli henger, melyben lévő transzducer a láb bemelegítésekor bekövetkező folyadéktérfogat-kiszorítást érzékeli. A térfogatot cm^3 -ben leolvashatjuk a digitális kijelzőről. A mérési adatokat végül a kezdeti értékekhez viszonyítjuk és az ödémát százalékban fejezzük ki (9.ábra).



9.ábra: Ugo Basile Plethysmometer

Szövetteni metszetek készítése és értékelése

A kísérlet végén Nembutallal történő túllaltatás után a tibiotarzális ízületeket kimetszettük. A mintákat ezután 8 órára 4%-os pufferolt formalinba helyeztük fixálás céljából. Ezután 8 órán keresztül 7 V/V% AlCl_3 -ot, 5 V/V% hangyasavat, és 8.5 V/V% sósavat tartalmazó oldatban dekalcináltuk őket 4°C -on (Schwab et al. 1997). Amikor az ízületek megfelelően felpuhultak, Sörensen-féle foszfát-pufferben 8 órán keresztül mostuk, majd megint 8-8 óráig 4°C -on 10-15 V/V%-os szacharóz-oldatokban dehidráltuk őket. Ezek után a mintákat paraffinba ágyasztuk, majd mikrotómmal 5-7 μm -es szeletekre vágtuk és végül hematoxilín-eozin eljárással megfestettük (Helyes et al. 2004). Az egyes ízületek 4-5 különböző rétegéből készült szelet, hogy átfogóbb képet kapjunk az ízületben lezajlott elváltozásokról.

A metszeteken látható gyulladásos elváltozásokat egy kísérleteinktől független patológus értékelte, előre megadott paraméterek alapján pontozva az egyes mintákat. A szinoviális kötőszövet megvastagodása, a leukociták infiltrációja, valamint a porc- és csontkárosodás mértéke alapján értékelte a mintákat. Minden esetben egy 0-3-ig terjedő skálán történt a pontozás, ahol a legjelentősebb elváltozást jellemeztük 3-assal. A csontdestrukció pontozása az alábbiak szerint alakult: 0=normális, 1=néhány helyen a csontszövet enyhe hiánya, 2=mérsékelt kortikális trabekuláris csontvesztés, 3=sok helyen a csont jelentős mértékű hiánya. Az egyes mintákra adott pontokat összeadtuk, így

minden mintára, ezáltal pedig minden kezelési csoportra egy összetett artritisz pontszámot kaptunk (Weinberg et al. 2003).

Carrageeninrel kiváltott akut lábduzzadás vizsgálata

Hím Wistar patkányok hátsó lábának talpába injektáltunk 100 μ l 3%-os carrageenin-oldatot, amellyel kevert típusú, neurogén és nem-neurogén komponensekből álló gyulladási reakciót idéztünk elő lokálisan (Poole et al. 1995; Doi et al. 2002). A lábduzzadás a harmadik órában éri el maximumát (Bölcskei et al. 2005), ezért a méréseket anyagadás előtt és anyagadás után 60, 120 és 180 perccel végeztük.

A lábduzzadást az előzőekben ismertetett Ugo Basile Plethysmometerrel határoztuk meg és az eredményeket itt is a kezdeti értékekhez százalékban viszonyítva értékeltük.

A carrageenin-adás előtt 15 perccel az állatok egy-egy csoportját oldószerrel, valamint 1, 10 és 100 μ g/kg J-2156-oldattal kezeltük intraperitoneálisan.

Mustárolajjal kiváltott akut neurogén bőrgyulladás vizsgálata

Hím Wistar patkányok mindkét hátsó végtagját nátrium-tiopental altatásban (50 mg/kg i.p.) akutan denerváltuk, vagyis a nervus saphenust és a nervus ischiadicust átvágtuk 30 perccel a kísérletet megelőzően, megakadályozva ezzel a mustárolaj nociceptív hatásából adódó központi idegrendszeri reflexválaszokat. A lábháti bőrt 1%-os, paraffinolajban oldott mustárolajjal bekentük, amely ebben a koncentrációban szelektíven izgatja a kapszaicin-érzékeny nociceptorokat, tehát kizárólag neurogén mechanizmussal okoz akut gyulladást (Jordt et al. 2004). Az ennek következtében kialakuló plazmafehérje-kiáramlás mértékét Evans kék akkumuláció módszerével határoztuk meg. Tíz perccel a mustárolajjal történő kenés előtt 50 mg/kg Evans kék festéket adtunk intravénásan, amely erősen kötődik albuminhoz, a plazma-extravazáció helyén kilép az érpályából és akkumulálódik a gyulladt szövetekben (10.ábra). Húsz perccel a gyulladás kiváltását követően az állatokat elvéreztettük, a kékült lábháti bőrterületeket kimetszettük, tömegüket megmértük és festéktartalmukat formamidban extraháltuk szobahőmérsékleten, 72 órán keresztül. A kioldódott festék mennyiségét 620 nm-en spektrofotométerrel (Labsystems) meghatároztuk, amely a plazmakiáramlás, vagyis a gyulladás mértékével egyenesen arányos. A kapott értékeket kalibrációs görbe segítségével μ g festék/g nedves szövet formában fejeztük ki.

A kontroll állatcsoportnak a J-2156 oldószerét, a kezeltnek J-2156-ot adtunk több dózisban (0.5-100 μ g/kg) intraperitoneálisan 20 perccel a gyulladás kiváltása előtt. A hatásidőtartam megállapításához a mustárolaj-kenés előtt 2 és 6 órával is adtuk i.p. a J-2156 10 μ g/kg dózisát.



10.ábra: Evans kék festék akkumulációja

Mustárolajjal kiváltott akut neurogén fülgyulladás vizsgálata

Hím Balb/c egereket ketamin-xylazin keverékkel (5 és 100 mg/kg i.p.) elaltattunk, majd 10-10 μ l 1%-os, paraffinolajban oldott mustárolajat kentünk ecsettel fülük mindkét oldalára. A mustárolaj az előbb ismertetett módon akut neurogén gyulladást idéz elő a kezelt felületen.

A fülék vastagságát mikrométerrel (11.ábra) mértük meg anyagadás előtt és négy alkalommal a három órás mérés során. A kialakult fülödémát a kezdeti értékekhez viszonyított százalékban fejeztük ki.

A J-2156 három dózisát (10, 50 és 100 μ g/kg), illetve oldószerét intraperitoneálisan adtuk az állatoknak 15 perccel a mustárolaj-kezelés előtt.



11.ábra: A mikrométer

Peritoneális makrofágok *in vitro* stimulálásával felszabaduló IL-1 β mennyiségének mérése

Nőstény CD1 egereket kezeltünk intraperitoneálisan *Salmonella typhi-murium*-ból származó lipopoliszachariddal, LPS-sel (300 μ l, 300 μ g/ml). Négy órával az injektálás után, amikor már megjelennek a makrofágok a hasüregben, az állatokat éteres altatásban dekapitáltuk és kivéztettük. A hasüreget ezután pasteur-pipettával alaposan átmostuk 2.5 ml jéghideg RPMI-médiával, ami tartalmazott 10% borjú szérum albumint (BSA) is. Az átmosás után a hasüregi folyadékot a pipetta segítségével begyűjtöttük és csövekben jégre tettük. A sejtenyészési módszert a Becton Dickinson Biosciences által megadott protokoll (Intracellular Staining Procedure) alapján az Immunológiai és Biotechnológiai Intézetben dolgozták ki, amit az alábbiak szerint módosítottam és állítottam be. A 24-lyukú sejtenyésző lemez (Greiner bio-one, Cellstar) minden lyukába 800 μ l RPMI-t (benne 80 μ l BSA) mértünk be, és hozzápipettáztunk 100 μ l hasüri folyadékot. Kétféle tenyésztést állítottunk össze a gyulladássos sejtek stimulálására: az egyik esetben 1-1 μ l 1 μ g/ml LPS-oldatot pipettáztunk a médiumhoz, a másik esetben 1-1 μ l 25 ng/ml-es forbol-12-mirisztát-13-acetát-oldatot (PMA) és 1-1 μ l 1 μ g/ml ionomicin-oldatot mértünk a lyukakba. Az LPS a Gram-negatív baktériumok sejtfalának alkotóeleme (endotoxin), amely aktiválja a makrofágokat és következményes gyulladássos citokinek, elsősorban IL-1 β felszabadulását okozza (Ulich et al. 1990). A PMA a protein kináz C aktiválásán keresztül erőteljes makrofág-stimulációt okoz, ami szintén IL-1 β felszabadulásához vezet (Blumberg 1988). Ezután mindkét összeállítás egyik felében 100 μ l fiziológiás sóoldatot, másik felében 100 μ l J-2156 négyféle koncentrációjú oldatának (0.1, 1, 10 és 100 μ g/ml) hozzáadásával vizsgáltuk a citokin-felszabadulás változását. A sejtenyésző lemezt 37°C-os CO₂-os termosztátban 8 órán keresztül inkubáltuk. A folyadékokat ekkor eppendorf-csövekbe gyűjtöttük, majd 12500 fordulat/perc sebességgel 10 percig centrifugáltuk. A felülúszókat ezután újabb eppendorf-csövekbe gyűjtöttük, majd felhasználásig -20°C-on tároltuk.

A mintáinkban termelt IL-1 β mennyiségét szendvics ELISA módszerrel határoztuk meg (BD Biosciences), a leolvasást pedig spektrofotométerrel (Labsystems) határoztuk meg 450 nm-en.

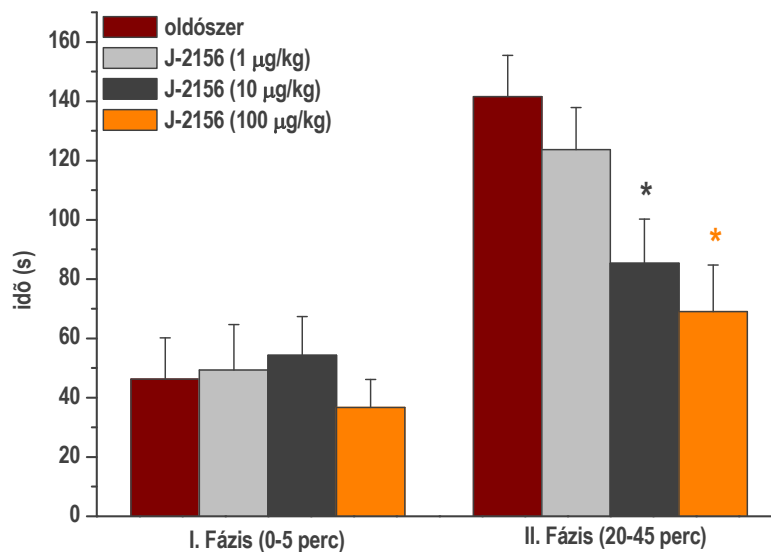
Statisztika

A formalin tesztben, a mustárolajjal kiváltott akut neurogén gyulladásban, és a két mechanonocicepciót vizsgáló modellben eredményeink értékeléséhez nem-parametrikus Mann-Witney U-tesztet, a szövettani eredmények értékeléséhez Kruskal-Wallis tesztet, az *in vitro* modellben Student-féle t-próbát, a lábduzzadás eredmények értékeléséhez pedig módosított Bonferroni t-tesztel kiegészített egyutas ANOVA-tesztet használtunk. Minden esetben a különböző csoportok közötti eredmények összehasonlításakor a * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ és *** $p < 0.001$ értékeket határoztuk meg szignifikánsnak.

3. EREDMÉNYEK

A J-2156 hatása a formalinnal kiváltott akut nocifenzív reakcióra

A J-2156 három különböző intraperitoneális dózisának hatását mértük formalinnal kiváltott akut nocifenzív reakció mindkét fázisában. Az első fázisban az oldószerrel kezelt és a különböző dózisú sst₄ receptor agonistával kezelt állatcsoportok közel azonos fájdalomelhárító viselkedési reakciót mutattak, vagyis a J-2156 hatástalannak bizonyult. Az akut gyulladásos folyamatok következtében kialakuló második szakaszban jól láthatóan közel háromszorosára emelkedett a nocifenzív viselkedés időtartama az oldószerrel kezelt kontroll csoportban, amelyre azonban a J-2156 szignifikáns és dóziszfüggő gátló hatást gyakorolt (12.ábra).

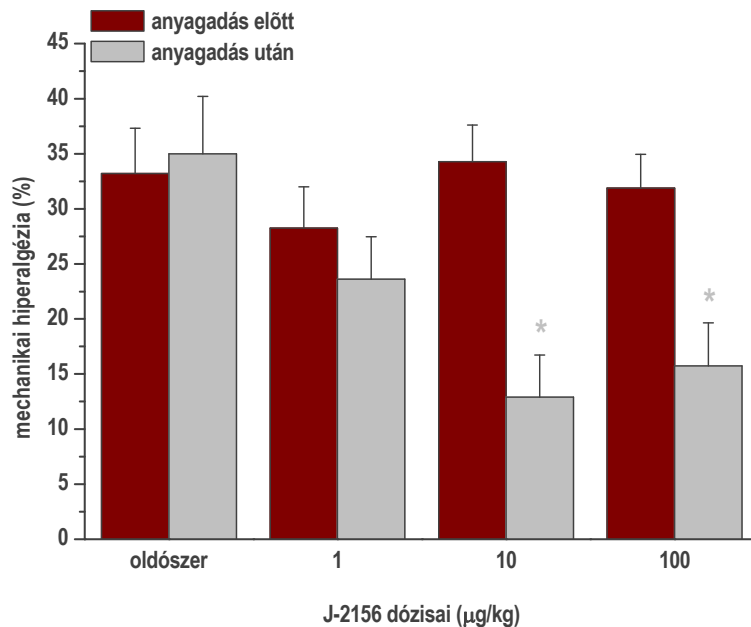


12.ábra: A J-2156 hatása a formalinnal kiváltott akut nocifenzív reakcióra
(az oszlopok n=9-10 mérés/csoport átlagait \pm S.E.M. mutatják,
ahol * $p < 0.05$ az oldószeres csoporthoz viszonyítva)

A J-2156 hatása a mechanikai hiperalgéziára traumás mononeuropátia modellben

A nervus ischiadicus részleges lekötése az operált láb mechanonociceptív küszöbének jelentős, 30-35%-os csökkenését okozta 7 nappal a műtétet követően. Ezt a neuropátiás hiperalgéziát a legkisebb dózisú, 1 µg/kg J-2156-kezelés az oldószerhez hasonlóan nem befolyásolta. A két nagyobb J-2156-

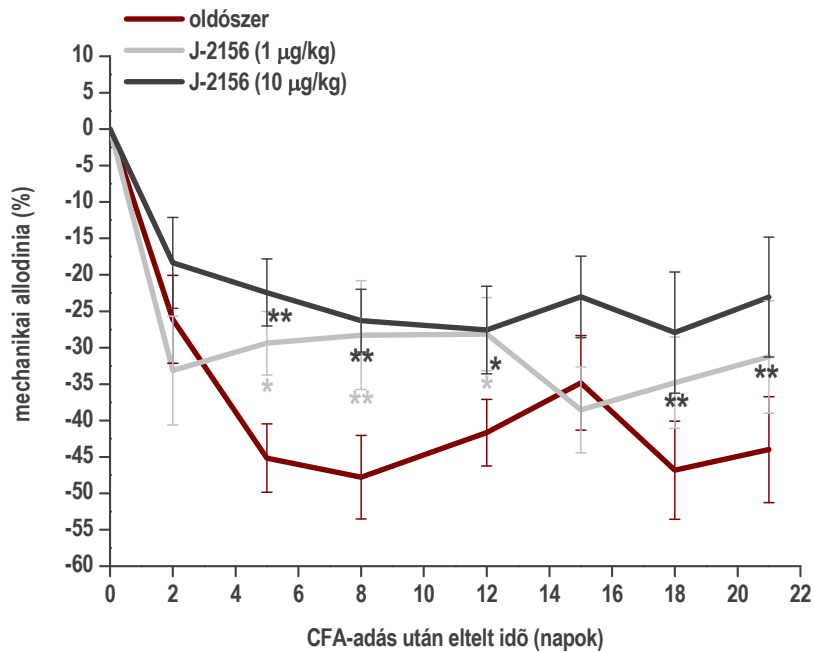
dózis azonban a hiperalgéziát a 7. napi kontroll érték felére, abszolútértékben az operáció előtti mechanonociceptív küszöbhez viszonyítva közel 15-18%-ra csökkentette. Ebben a modellben dózis-hatás összefüggés nem volt megfigyelhető (13.ábra).



13.ábra: A J-2156 hatása a mechanikai hiperalgéziára traumás mononeuropátia modellben
(az oszlopok n=6-9 mérés/csoport átlagait ± S.E.M. mutatják, ahol *p<0.05 az oldószeres csoporthoz viszonyítva)

A J-2156 hatása az adjuvánszal kiváltott gyulladáshoz mechanikai allodiniára

A fiziológiás sóval (oldószerszerrel) kezelt kontroll csoportban a CFA-injekció az 5. napon 50%-os érintési érzékenység fokozódást okozott a kezdeti küszöbértékekhez viszonyítva, ami szinte változatlanul fennmaradt a 21 napos kísérlet ideje alatt. Ezzel szemben a J-2156-tal kezelt állatcsoportok mindkét vizsgált dózis esetén jelentősen kisebb mértékű mechanikai allodiniát mutattak. A 10 µg/kg-os dózisonál minden mérési napon szignifikánsan, 25-30%-kal kisebb allodiniát mértünk a kontrollhoz képest, vagyis közel 50%-os antiallodiniás hatást tapasztaltunk. A kisebb, 1 µg/kg dózisú J-2156-tal kezelt csoportban a kontrolltól való eltérés 30-35% körüli volt, így nem minden mérési napon volt kimutatható szignifikánsan kisebb érintési érzékenység (14.ábra).



14.ábra: A J-2156 hatása az adjuvánssal kiváltott gyulladásos mechanikai allodiniára
(a mérési pontok n=6-9 mérés/csoport átlagait ± S.E.M. mutatják, ahol *p<0.05 és **p<0.01 az oldószeres csoporthoz viszonyítva)

A J-2156 hatása az adjuvánssal kiváltott lábduzzadásra

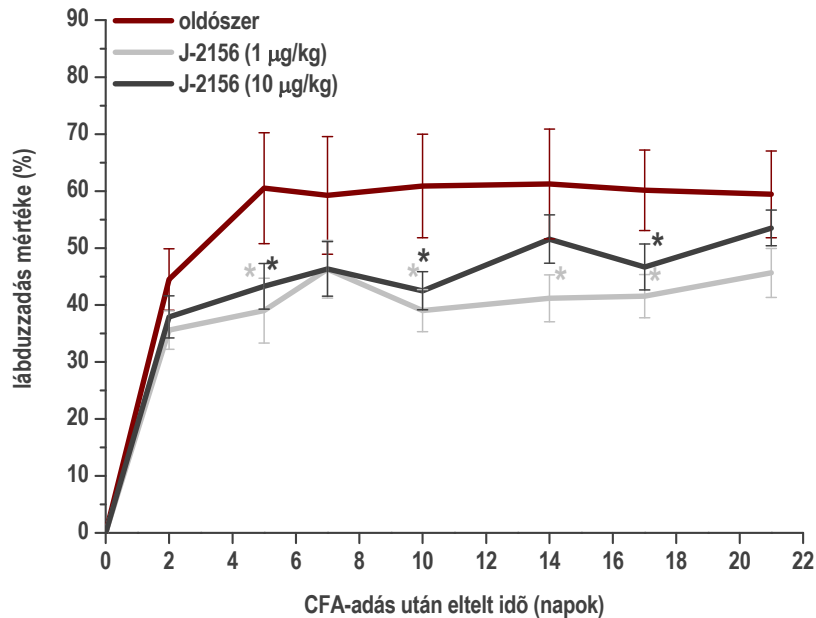
A lábak térfogata az oldószerrel kezelt csoportban a kezdeti $0.79 \pm 0.01 \text{ cm}^3$ értékről jelentősen megemelkedett, maximumát, $1.28 \pm 0.1 \text{ cm}^3$ térfogatot a 10. mérési napon érte el, ez 61%-os ödémaképződést jelent. A gyulladás következtében kifejlődött lábduzzadás a teljes 21 napos kísérlet alatt nagyjából ezen az értéken maradt.

A J-2156 szinte az összes mérési napon mindkét dózisban szignifikánsan csökkentette az ödémát. Ez a gátlás legerőteljesebben szintén a 10. napon érvényesült, az alacsonyabb ($1 \mu\text{g/kg}$) dózis 39%-ra, a $10 \mu\text{g/kg}$ pedig 42.5%-ra csökkentette a duzzadást, dózis-hatás összefüggést nem tapasztaltunk (15. ábra).

A J-2156 hatása az ízületi szövettani elváltozásokra

A szövettani metszeteken az ép, intakt ízületi szerkezettel összehasonlítva a CFA-val kezelt tibio-tarzális ízületekben az ízületi üreg kiszélesedett, pannus képződött, a szinoviális kötőszövet mononukleáris sejtekkel sűrűn infiltrált, a porcszövet nagymértékben lepusztult és erőteljes, masszív csontkárosodás látható. Az összetett szövettani pontszám ebben a csoportban 6.6 ± 0.7 . A teljes kísérlet alatt a napi háromszori J-2156-kezelés jelentősen csökkentette az elváltozásokat, kisebb lett a szinoviális megvastagodás, a mononukleáris sejtek infiltráltsága is kevésbé volt kifejezett. Kisebb mértékű porcdestrukció ugyan helyenként megfigyelhető volt, csontkárosodás azonban nem volt

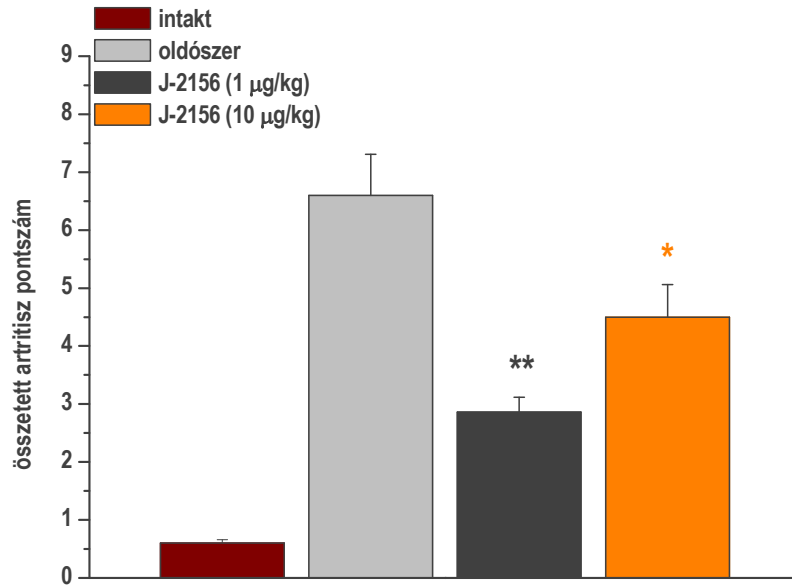
tapasztalható. A kisebb dózisonál az összetett artritisz pontszám 2.86 ± 0.86 , a nagyobb dózisonál 4.5 ± 0.56 értékre csökkent (16.ábra).



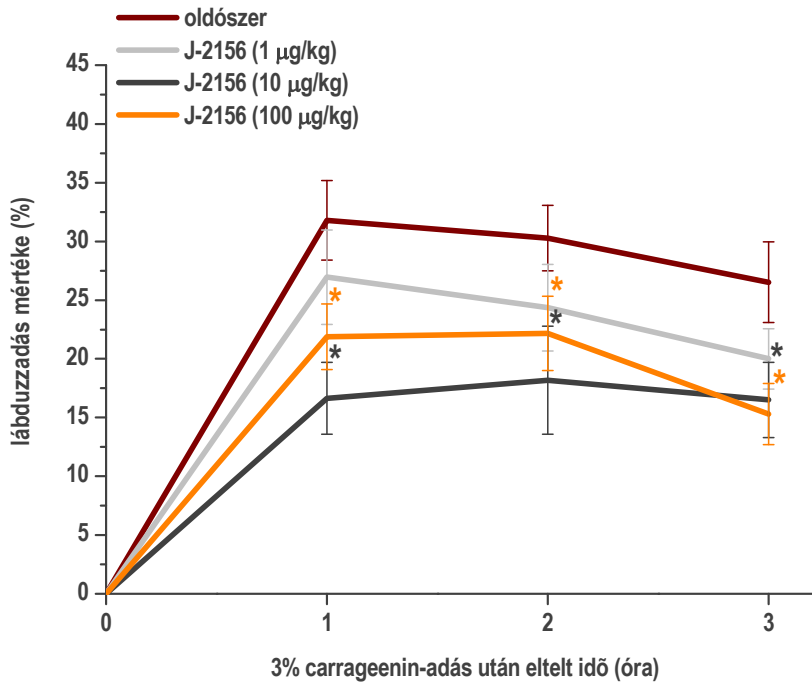
15.ábra: A J-2156 hatása az adjuvánsal kiváltott lábduzzadásra (a mérési pontok n=6-9 mérés/csoport átlagait \pm S.E.M. mutatják, ahol * $p < 0.05$ az oldószeres csoporthoz viszonyítva)

A J-2156 hatása a carrageeninnel kiváltott lábduzzadásra

A kontroll csoportban a carrageenin intraplantáris adása után egy órával 32%, két órával 30%, három órával pedig 27% lábduzzadást tapasztaltunk. Ezt a carrageeninnel kiváltott ödémaképződést mérsékelte a legalacsonyabb dózisú J-2156, a kezdeti értékekhez képest rendre 27, 24 és 20%-os duzzadást mértünk. A két nagyobb dózissal kezelt állatcsoportban mindhárom mérési időpontban szignifikánsan kisebb ödéma alakult ki a kontroll csoporthoz képest. A 10 µg/kg hatására a szignifikáns eltérés kifejezettebb volt (17, 18 és 17% ebben a sorrendben), mint a 100 µg/kg esetében (rendre 22, 22, 15%). A J-2156 gátló hatása tehát e modellben sem dóziszfüggő (17.ábra).



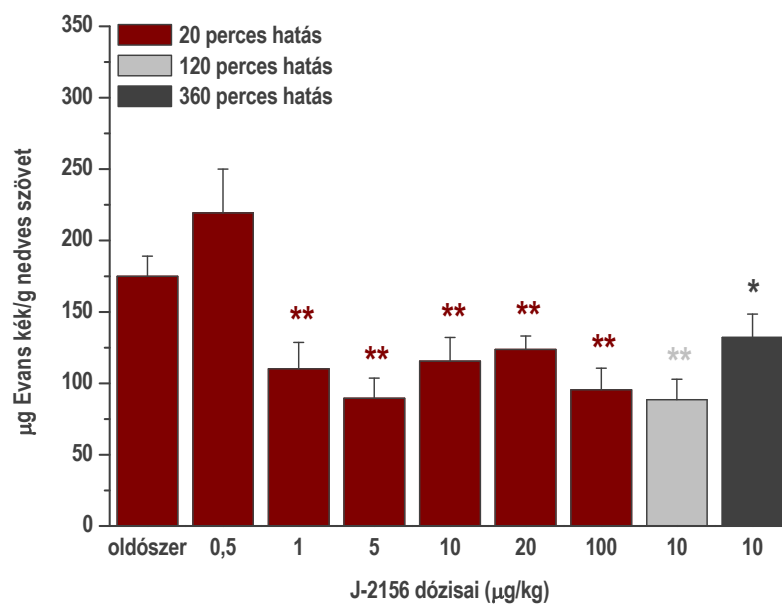
16.ábra: A J-2156 hatása az ízületi szövettani elváltozásokra
 (az oszlopok n=6-9 mérés/csoport átlagait ± S.E.M. mutatják, ahol *p<0.05 és **p<0.01 az oldószeres csoporthoz viszonyítva)



17.ábra: A J-2156 hatása a carrageeninnel kiváltott lábduzzadásra
 (a mérési pontok n=6-9 mérés/csoport átlagait ± S.E.M. mutatják, ahol *p<0.05 az oldószeres csoporthoz viszonyítva)

A J-2156 hatása mustárolajjal kiváltott akut neurogén bőrgyulladásra

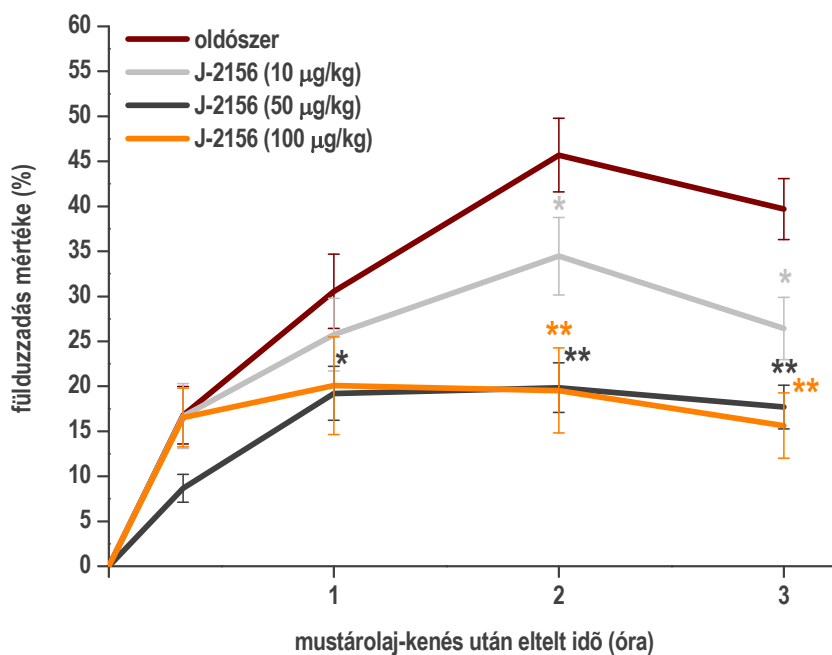
A J-2156 hat különböző i.p. dózisa (0.1 és 100 µg/kg között) 20 perccel a gyulladás kiváltása előtt beadva szignifikáns, de nem dóziszfüggő módon gátolta a mustárolajjal előidézett gyulladást patkány lábháti bőrében. Az oldószeres csoportban 175±14 µg/g nedves szövet Evans kék akkumulációt mértünk, ami a J-2156 hatására 90-110±15 µg/kg értékre csökkent. A 10 µg/kg J-2156 gátló hatása 120, valamint 360 perc múlva is szignifikánsnak bizonyult, az utóbbi esetben az Evans kék akkumuláció 132.2±16.3 µg/g nedves bőr volt (18.ábra).



18.ábra: A J-2156 hatása mustárolajjal kiváltott akut neurogén bőrgyulladásra
(az oszlopok n=8-10 mérés/csoport átlagait ± S.E.M. mutatják, ahol *p<0.05 és **p<0.01 az oldószeres csoporthoz viszonyítva)

A J-2156 hatása mustárolajjal kiváltott akut neurogén fülgyulladásra

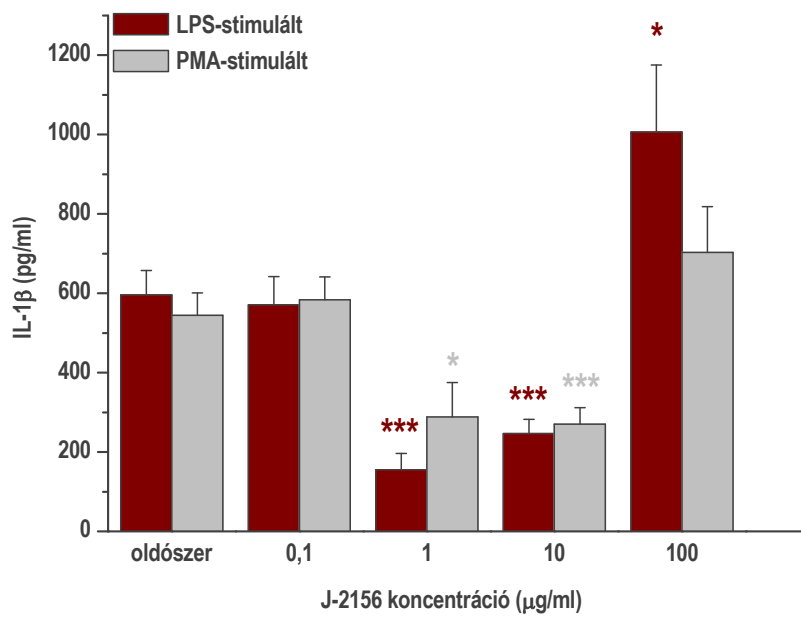
A kontroll csoportban a fül vastagsága 262±17 µm-ről 381±26 µm-re duzzadt 3 órával a mustárolajjal történő kenés után. A J-2156 mindhárom dóziséval (10, 50, 100 µg/kg i.p.) történő előkezelés két, illetve három órával a kenés után szignifikánsan csökkentette a mustárolajjal kiváltott fülduzzadást 39.7±3.4%-ról 20-25%-ra. A 20. percben szignifikáns gátlást csak az 50 µg/kg dózisú J-2156 adásakor tapasztaltunk, itt a 16.8±3.2%-os duzzadás 8.7±1.5%-ra csökkent (19.ábra). Dózis-hatás összefüggés ebben a modellben sem volt kimutatható.



19.ábra: A J-2156 hatása mustárolajjal kiváltott akut neurogén fűluzadásra (a mérési pontok n=8-10 mérés/csoport átlagait \pm S.E.M. mutatják, ahol * $p < 0.05$ és ** $p < 0.01$ az oldószeres csoporthoz viszonyítva)

A J-2156 hatása peritoneális makrofágok *in vitro* stimulálásával felszabaduló IL-1 β -mennyiségre

A sejtenyésztés eredményeképpen kapott IL-1 β mennyiségét szendvics ELISA módszerrel, pg/ml koncentrációban határoztuk meg. Az LPS- és a PMA-stimulálás között semmilyen eltérést nem tapasztaltunk egyik összeállításban sem, a makrofágok stimulációja, ezáltal az IL-1 β -termelés kiváltása mindkét összeállításban jól működött. Az oldószerrel kezelt, kontrollként használt sejtekben az LPS 595.3 ± 61.7 pg/ml, a PMA 544.6 ± 56.5 pg/ml IL-1 β -termelést váltott ki. Ehhez képest a J-2156-tal való kezelés koncentrációfüggő módon csökkentette e citokin termelését. Bár a legkisebb, 0.1 μ g/ml-es oldatnak nem volt hatása, az 1 μ g/ml-es oldat már szignifikáns gátlást okozott, a 10 μ g/ml-es koncentráció esetében pedig még nagyobb mértékű, közel 50-60%-os gátló hatást tapasztaltunk. Meglepő módon a legnagyobb, 100 μ g/ml-es J-2156-oldattal való kezelés hatására megemelkedett az IL-1 β mennyisége (20.ábra).



20.ábra: A J-2156 hatása peritoneális makrofágok *in vitro* stimulálásával felszabaduló IL-1 β -mennyiségre

(az oszlopok $n=16-20$ mérés/csoport átlagait \pm S.E.M. mutatják, ahol * $p<0.05$ és *** $p<0.001$ az oldószeres csoporthoz viszonyítva)

4. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

Jelen eredményeink azt igazolják, hogy a peptidomimetikus J-2156, ami a szomatosztatin sst₄ receptorhoz nagyfokú specificitással és nagy affinitással kötődő agonista, képes hatékonyan gátolni a nocifenzív reakciót klasszikus akut kemonociceptív modellben (formalin teszt) egérben, valamint két különböző krónikus fájdalommodellben (adjuváns-indukálta fájdalom és traumás mononeuropátia) patkányban. Hatékonyan gátolta továbbá az akut gyulladást patkány talpban, bőrön és egér fülön. A vegyület antiinflammatorikus hatása az *in vitro* sejtenyésztésben is megmutatkozott, koncentrációfüggő módon gátolta a stimulált peritoneális makrofágok IL-1 β -termelését.

A szomatosztatin sst₄ receptor a G_i-proteinhez kapcsolt receptorcsalád tagja (Hoyer et al. 1995). Aktivációjakor gátlódik a cAMP szintézise, valamint a protein kináz A aktivitása (Patel et al. 1995). Ezek mellett a receptor aktiválása megnyitja a K⁺-csatornák és blokkolja a feszültségfüggő Ca²⁺-csatornák működését (Koch et al. 1988). Ezen hatások következménye a neurotranszmitterek felszabadulásának gátlása (Weckbecker et al. 2003). Az sst₄ receptor agonistái felerősítik továbbá a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK), a foszfolipáz C és foszfolipáz A₂ által közvetített jelátviteli utakat is (Weckbecker et al. 2003). A J-2156-tal végzett egyéb kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy ez az agonista hatékonyan gátolt különböző gyulladásos folyamatokat is patkányban, valószínűleg részben a neurogén komponensért felelős P-anyag és CGRP szenzoros idegvégződésekből történő felszabadulásának gátlásán keresztül. E peptidfelszabadulást gátló mechanizmust izolált tracheán korábban egyértelműen bizonyítottuk (Helyes et al. 2006).

Korábban vizsgáltuk a TT-232, egy periférián ható heptapeptid szerkezetű szomatosztatin sst₁ és sst₄ receptor agonista fájdalomcsillapító hatásait is (Helyes et al. 2000; Pintér et al. 2002; Helyes et al. 2004, 2005). A TT-232 az akut szomatikus nocicepció vizsgálatára alkalmas formalin teszt mindkét fázisában hatékonyan gátolta a nocifenzív viselkedést, más modellekben pedig csökkentette a krónikus gyulladásos allodiniát és a traumás mononeuropatiás fájdalmat is (Pintér et al. 2002; Szolcsányi et al. 2004; Helyes et al. 2004, 2005). A J-2156-nak azonban több előnye is van a TT-232-vel szemben: nagyfokú szelektivitása az sst₄ receptor-altípusra vonatkozóan, valamint nem-peptid szerkezete, ami lehetővé teszi az orális adagolást is. Mivel szelektíven csak az sst₄ receptoron fejti ki hatását, így adásakor elmaradnak a szomatosztatin agonistáknál tapasztalt gyakori endokrin mellékhatások, mint a növekedési hormon, a glukagon, az inzulin felszabadulásának gátlása, ezek ugyanis főként az sst₂, sst₃ és sst₅ receptor-altípusokhoz (SRIF2 receptorcsalád) kapcsolhatók (Weckbecker et al. 2003).

A szelektív sst₄ receptor agonista J-2156-tal végzett kísérleteinkben bebizonyosodott tehát, hogy ez a molekula több modellben antinociceptív, antiallodiniás és gyulladásgátló hatásokkal rendelkezik. Bár az sst₄ receptor pontos lokalizációjára vonatkozóan kevés irodalmi adat áll rendelkezésre (Pintér et al. 2006), ezen agonistával nyert funkcionális adatok alapján valószínű, hogy e gátló hatások magukon az érzőideg-végződéseken, valamint az érfali endotélsejteken és a gyulladással járó sejteken lévő sst₄ receptor-aktiváción keresztül valósulnak meg. Ez utóbbira direkt *in vitro* bizonyítékot a peritoneális makrofágok IL-1 β -termelésének gátlásával szolgáltatunk az általam kidolgozott kísérleti elrendezésben.

Eredményeink rendkívül nagy gyakorlati jelentőségét hangsúlyozza az a tény, hogy a krónikus neuropátiás fájdalom terápiás kezelésére jelenleg nincs megoldás, a nem szteroid gyulladásgátlók és az opioidok szinte teljesen hatástalanok (DelleMijn 1999). Bizonyos neuropátiás állapotokban próbálkoznak ugyan adjuváns analgetikumokkal (antiepileptikumokkal, antidepresszánsokkal) történő kezeléssel, de részben a nem kielégítő terápiás hatás, részben a mellékhatások miatt ezek nem jelentenek igazán jó megoldást. A neurogén gyulladással járó komponens, amely sokféle krónikus gyulladással járó betegség, például a reumatoid arthritis, asztma vagy ekcéma patomechanizmusában jelentős szerepet játszik (Helyes et al. 2003), egyedül a nagy dózisú szteroidok képesek csökkenteni, de számos súlyos mellékhatásuk miatt nem lehet ezek hosszútávú terápiás alkalmazásával számolni.

Eredményeink alapján a szomatosztatin sst₄ receptor gyógyszerfejlesztési szempontból kiváló target lehet, és stabil, szelektív sst₄ agonisták új, ígéretes utakat nyithatnak meg a fájdalomcsillapítás és a gyulladással járó folyamatok neurogén komponensének kezelése területén.

II. FEJEZET

A HIPOFÍZIS ADENILÁT CIKLÁZ-AKTIVÁLÓ POLIPEPTID (PACAP-38) ELTÉRŐ PERIFÉRIÁS HATÁSAI PATKÁNY ÉS EGÉR FÁJDALOMMODELLEKBEN

A fejezet alapjául szolgáló közlemény:

K Sándor, K Bölcskei, JJ McDougall, N Schuelert, D Reglődi, K Elekes, G Pethő, E Pintér, J Szolcsányi,
Zs Helyes: **Divergent peripheral effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38
on nociception in rats and mice.**

Pain, közlésre elküldve

1. BEVEZETÉS

A 38 aminosavból álló hipofízis adenilát cikláz-aktiváló polipeptid (Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide, PACAP-38) a vazóaktív intesztinális peptid (VIP), szekretin és glukagon család tagja. Először birka hipotalamuszából izolálták (Miyata et al. 1989). Nagy mennyiségben fordul elő a központi idegrendszerben és az endokrin szervekben. Szenzoros neuropeptidként tartják számon, mivel megtalálható a gerincvelő hátsó szarvában (Dickinson & Fleetwood-Walker 1999; Dickinson et al. 1999), a hátsó gyöki ganglionokban (Moller et al. 1993; Mulder et al. 1994), a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok perifériás végződéseiben (Zhang et al. 1996; Fahrenkrug & Hannibal 1998), például az ízületi tokot ellátó érző rostokban (Uddmann et al. 1998). E morfológiai és molekuláris biológiai adatokon túl előzetes saját eredményeink azt is igazolták, hogy a kapszaicin-érzékeny rostokból a PACAP-38 stimuláció hatására *in vitro* és *in vivo* is felszabadul (Németh et al. 2006; Helyes et al. 2007). Ezen eredmények alapján feltételezhető volt, hogy a PACAP részt vesz a nociceptív folyamatokban, azonban ezt az elképzelést rendkívül kevés funkcionális adat támasztotta alá. Az összes erre irányuló *in vivo* kísérletben a PACAP központi idegrendszeri hatásait vizsgálták, és meglehetősen ellentmondásos eredményekre jutottak (Shimizu et al. 2004). Az intratekálisan adott PACAP gátolta a nociceptív reflexműködést (Zhang et al. 1993) és a gyulladás következtében kialakuló nocicepciót (Yamamoto & Tatsuno 1995; Zhang et al. 1996; Onou et al. 2007). Intracerebroventrikulárisan adva a PACAP a formalin teszt korai fázisában analgetikus hatásúnak, míg a késői fázisban pronociceptívnek bizonyult (Shimizu et al. 2004). Másrésről azonban a központi idegrendszerbe adott PACAP dóziszfüggő módon csökkentette a hőküszöböt a talpban, és szerepet játszott a nociceptív stimulus hátsó szarvba történő közvetítésében, elsősorban N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptorokon keresztül (Ohsawa et al. 2002).

A PACAP $G_{s/q}$ -proteinhez kötött receptorokon fejti ki hatásait. A PAC1 receptor specifikusan a PACAP-ot köti, míg a VPAC1/VPAC2 receptorok azonos affinitással rendelkeznek a VIP és a PACAP iránt. Mindhárom receptortípust leírták neuronokon, simaizomsejteken és számos gyulladássos sejten (Dickinson & Fleetwood-Walker 1999; Vaudry et al. 2000; Zhou et al. 2002; Somogyvári-Vígh & Reglődi 2004).

Korábbi vizsgálataink igazolták, hogy a PACAP-38 gátolja proinflammatorikus és pronociceptív szenzoros neuropeptidek, P-anyag és CGRP kapszaicin-érzékeny érzőidegek végződéseiből kémiai és elektromos téringerléssel kiváltott felszabadulását *in vitro* (Németh et al. 2006). *In vivo* gátolta továbbá az akut neurogén és nem-neurogén gyulladássos folyamatokat patkányban és egerben egyaránt (Helyes

et al. 2004; Németh et al. 2006). Ezen eredményeink erősítik azt a feltevést, hogy a PACAP-nak szerepe lehet a nocicepció perifériás folyamataiban. Mivel a PACAP-38 perifériás nociceptív folyamatokban betöltött hatásaira vonatkozóan nem áll rendelkezésre adat, jelen kísérletsorozatunkban vizsgáltuk, hogyan hat a lokálisan/szisztémásan adott PACAP akut viscerális és szomatikus nocifenzív viselkedésben, gyulladásos és neuropátiás mechanikai hiperalgéziában, valamint enyhe hőtraumával kiváltott termális hiperalgéziában.

2. KÍSÉRLETI MODELLEK, VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

Állatok

A kísérleteket hím és nőtény Wistar patkányokon (180-250 g), valamint hím CD1 egereken (20-25 g) végeztük, amelyek standard rágcsálótápot kaptak. A patkányokat a Pécsi Tudományegyetem Központi Állatházában tartottuk standard, apatogén körülmények között, az egerek a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet saját állatházából származtak.

Kísérleteink minden esetben megfelelnek az állatkísérletek végzéséről szóló 243/1998. számú kormányrendelet előírásainak, kísérleti modellekre és vizsgálati módszerekre a Pécsi Tudományegyetem állatkísérletekkel foglalkozó Etikai Bizottságának engedélyével rendelkezünk (engedélyszám: BA 02/2000-16-2006). Az elektrofiziológiai vizsgálatsorozat a Calgary Egyetem Biofizikai és Élettani Intézetében történt Wistar patkányokon (250-450 g), munkacsoportunkkal történő kollaboráció keretein belül. A kísérletek minden esetben igazodtak a fájdalom tanulmányozására létrehozott nemzetközi tanács javaslataihoz (Zimmermann 1983).

Formalinnal kiváltotta akut szomatikus nocicepció vizsgálata

Hím Wistar patkányok bal hátsó lábának talpába 50 µl 2.5%-os formalin-oldatot injektáltunk. Ez a kezelés két fázisban vált ki nocifenzív reakciót az állatokban, elsőként egy direkt kemonociceptív hatás jelentkezik, ami körülbelül 5 percig tart, ez az I. fázis. A II. fázis a 20-45. percben zajlik, ekkor már gyulladásos folyamatok váltják ki a nocifenzív viselkedést (Tjolsen et al. 1992). Patkányok e tesztben az egerektől eltérő mintázatú elhárító viselkedést mutatnak, nemcsak lábnyalásokat, hanem jellegzetes emelgetéseket is végeznek. Ezért az előző fejezetben ismertetettől eltérően e patkánymodellben a nocifenzív reakció mértékét a kezelt láb emelgetésének számából és nyalogatásának időtartamából számított összetett fájdalompontszám segítségével határoztuk meg mindkét fázisban az alábbi módon: Összetett fájdalompontszám=(lábemelések száma+lábnyalogatás időtartamának kétszerese)/vizsgálati időtartam (Watson et al. 1997).

Formalin-adás előtt 5 perccel az állatokat intraplantárisan kezeltük 100-100 µl fiziológiás sóval, illetve 2 µM PACAP-38-al. A PAC1 és VPAC receptorok szerepének vizsgálatára külön állatcsoportokban a PACAP-38 (50 µl, 4 µM) adása előtt 5 perccel tízszeres mennyiségben (50 µl, 40 µM) két különböző antagonistát injektáltunk intraplantárisan: a PAC1 receptor-szelektív M65 kódjelű vegyületet (Abad et al. 2006), illetve a VPAC1/VPAC2 receptorokon ható [D-p-CI-Phe⁶,Leu¹⁷]-VIP-et (Somogyvári-Vígh & Reglődi 2004). Kontrollként fiziológiás sódatot használtunk.

Enyhe hőtraumával kiváltott termális hiperalgémia vizsgálata

Nőstény Wistar patkányok fájdalmas hőküszöbét egy munkacsoportunk és az Experimetria Kft. (Budapest) által kidolgozott és validált (Bölcskei et al. 2007) emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel határoztuk meg. A készülék a fájdalmas hőküszöb meghatározására alkalmas, ami a legalacsonyabb olyan vízhőmérséklet, amiből az állat kirántja a lábát. A vízfürdő hőmérséklete 30°C-ról indul és percenként 24°C-ot emelkedik fokozatosan, elérve a felső határt, az 53°C-t. Az állatokat lazán tartva, stabilan megfoglaljuk, és egyik hátsó lábukat a 30°C-os vízfürdőbe merítjük, majd elindítjuk a hőmérséklet emelését. Abban a pillanatban, hogy az állat kihúzza a lábát a vízből, a mérést megállítjuk, majd a kapott hőmérsékletküszöböt a digitális kijelzőről leolvassuk (21.ábra). Ez az érték az állat fájdalmas hőküszöbe.



21.ábra: Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdő

Ezután az állatokat dietil-éterrel elaltatjuk, és egyik hátsó lábukat konstans hőmérsékletű, 51°C-os, tehát már enyhe hőtraumát kiváltó hőmérsékletű vízfürdőbe merítjük 20 másodpercre. A kezelés után 10 és 20 perccel az állatok hőküszöbét újra meghatároztuk, hogy meggyőződjünk a termális hiperalgémia kialakulásáról.

A 20 perces mérés után 100-100 μ l fiziológias só, illetve 2 μ M PACAP-38-at injektáltunk intraplantárisan az állatoknak. Az anyag hatását a hőküszöb-értékekre 10 percenként mértük. A

termális hiperalgéziát az adott időpontban mért küszöbértékek hőtrauma előtti kontroll értékeihez viszonyított százalékban adtuk meg.

Ebben a modellben is vizsgáltuk a PACAP-hatásban a receptorok szerepét. Öt perccel a PACAP-38 (50 μ l, 4 μ M) adása előtt egy állatcsoport 50 μ l 40 μ M PAC1 receptor-szelektív antagonistá M65-oldatot, egy másik állatcsoport olyanekora dózissal VPAC1/VPAC2 receptorokon ható antagonistá [D-p-CI-Phe⁶,Leu¹⁷]-VIP-oldatot kapott intraplantárisan. Kontrollként oldószert, fiziológias sóoldatot adtunk.

Carrageeninrel kiváltott gyulladásos mechanikai allodinia

Wistar patkányok egyik hátsó lábának talpába 50 μ l 3%-os carrageenin-oldatot injektáltunk, másik hátsó lábukat kontrollként használtuk. A carrageenin kevert típusú akut gyulladásos reakciót vált ki a talpban, ami maximumát anyagadás után 3 órával éri el (Bölcskei et al. 2005). A méréseket ezért anyagadás előtt, valamint 120 és 180 perccel utána végeztük. A mechanikai érzékenységet ennél a modellnél szintén Ugo Basile Dynamic Plantar Aesthesiometerrel mértük, aminek a részletes működési elve megtalálható az I. Fejezet Kísérleti modellek, vizsgálati módszerek részében.

A PACAP-38 2 μ M koncentrációjú oldatából (fiziológias sóoldatban oldva), illetve oldószereből 100-100 μ l-t az egyes mérések előtt 5 perccel adtuk intraplantárisan. Az eredményeket a carrageenin-adás előtti kontroll küszöbökhez viszonyítva százalékban fejeztük ki.

A PACAP-38 hatásának vizsgálata a mechano-és termonociceptív küszöbökre

Patkányban a PACAP-38 intraplantáris adása (100 μ l, 2 μ M) előtt és 10 perccel utána a mechanonociceptív küszöböt Dynamic Plantar Aesthesiometerrel, valamint a termonociceptív küszöböt emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel mértük.

Ecetsavval kiváltott akut viscerális nocicepció vizsgálata vonaglási teszttel

A viscerális kemonocicepciót hím CD1 egereken váltottuk ki 200 μ l 3%-os ecetsav-oldat intraperitoneális adásával. A peritoneum kémiai izgatásának hatására alhasi izomösszehúzódnások, úgynevezett vonaglások következnek be, amelyek tipikus nocifenzív viselkedésnek tekinthetők (Eckhardt et al. 1958; Koster et al. 1959; Le Bars et al. 2001). Az egereket zárt műanyag ketrecbe tettük, a vonaglásokot az anyagadást követően 20 percig számoltuk.

A PACAP-38-at (100 μ g/kg), illetve a fiziológias sóoldatot 30 perccel az ecetsavval való kezelés előtt szubkután adtuk az egereknek. Mivel a PACAP-38 nagy méretű peptidként nem jut át a vér-agy gáton, a szisztémás adás következtében létrejövő válaszokat is perifériás hatásként értelmezhetjük.

Mechanikai hiperalgéria vizsgálata traumás mononeuropátiában

A műtéthez az egereket ketamin-xylazin keverék (100 és 5 mg/kg) intraperitoneális adásával altattuk el. Az egyik oldali nervus ischiadicust az állat combján kipreparáltuk, majd az ideg 1/3-1/2-ed részét óvatosan elválasztottuk, és 9-0-s szilikonos varróanyaggal szorosan lekötöttük, majd a sebet bezártuk. A nervus ischiadicus egyoldali részleges lekötése a végtag spontán fájdalmát és mechanonociceptív küszöbének csökkenését idézi elő (Seltzer et al. 1990). A műtétet követően az állatokat 8 napig hagytuk felépülni.

A mechanikai hiperalgéria értékét a korábban már többször leírt Dynamic Plantar Aesthesiometerrel mértük a műtétet követő 7. napon. A mérési eredményeket a kontrollhoz viszonyítva, százalékosan fejeztük ki.

A PACAP-38 két dózist (10 és 100 µg/kg), illetve oldószerét intraperitoneálisan adtuk 30 perccel a mérések előtt az állatoknak.

A térdízület primér afferenseinek elektrofiziológiai vizsgálata

Ez a kísérletsorozat nem munkacsoportunkban, hanem egy kollaboráció keretein belül a Calgary Egyetem Élettani és Biofizikai Intézetében történt, az eredmények tehát nem saját kísérleti adataim. A PACAP-38 perifériás hatásainak komplex megértése és a helyes következtetések levonása céljából azonban fontosnak tartom e kísérlet ismertetését is.

Mély uterán (25% törzsoldat; 2 g/kg, i.p.) altatásban hím Wistar patkányok jobb térdízületében 100-100 µl 2-2% kaolin- és carrageenin-injekcióval akut szinoviális gyulladást váltottak ki, amely 3-6 óra alatt kialakult. Ezalatt az állatok maghőmérsékletét melegítő segítségével 37°C-on tartották. A femur középső részére illesztett sztereotaxikus kerethez csatlakozó rögzítő segítségével a jobb csípőízületet immobilizálták. A lábat egy műanyag tok segítségével egy standard rotációt kiváltó készülékhez (MVD2510 Hottinger-Baldwin Messtechnik, Németország) kapcsolták. Végül a végtag közepén hosszanti metszést ejtettek, a térdízület feletti bőrlebenyeket egy „O” alakú keretre felvarrták és a keletkezett medencét meleg paraffinolajjal töltötték ki.

A nervus saphenust az ízületől disztálisan, a lábból eredő szenzoros jelek kiküszöbölése céljából, a lágyéki régióban pedig a gerincvelői reflexek kivédése érdekében átvágták. A proximális idegcsonk axonkötegeit platina elektródra helyezték és onnan vezették el az elektromos aktivitásokat. Az akciós potenciálokat előerősítő (DAM80 World Precision Instruments, USA, beállítások: gain X10000, alsó szűrő 300Hz, felső szűrő 1 kHz) és erősítő (gain X10) segítségével felerősítették. A térdízületből eredő afferens rostokat az ízület vékony, tompa üvegszállal történő érintése segítségével azonosították. A vizsgált idegrostok vezetési sebességét a beidegzett terület elektromos ingerlését (0.2 Hz, 100 ms pulzusszélesség, 6-12 V) követő latencia mérésével határozták meg.

E vizsgálatban összesen 28 rostot vizsgáltak a térdízület 10 másodpercig tartó normál rotációja (14–22 mNm) alatt. A három, egyenként 10 másodpercig tartó mozgási ciklus alatt mért idegi aktivitások átlaga adta meg a kontroll értéket.

A PACAP-38-at Tyrode-oldatban oldották és lokális alkalmazása a saphenus artériába történő bolus-injekcióval (0.2, 2 μ M; 0.1 ml bolus) történt. Ezt követően minden 1., 3., 5., 7., 9. és 11. percben vizsgálták az afferens idegaktivitást, az adatokat speciális program (CED1401 Cambridge Electronic Design, Egyesült Királyság) segítségével regisztrálták és offline értékelték. Az egyes rotációk hatására létrejövő akciós potenciálok számát Spike 2 szoftverrel számolták és a PACAP-38-kezelés mellett kialakuló afferens aktivitást a kontroll értékekhez viszonyított százalékban adták meg. Szenzitizációnak azt tekintették, ha az oldószeres kontroll érték feletti afferens aktivitás-változás nagyobb volt, mint a standard deviáció.

Statisztika

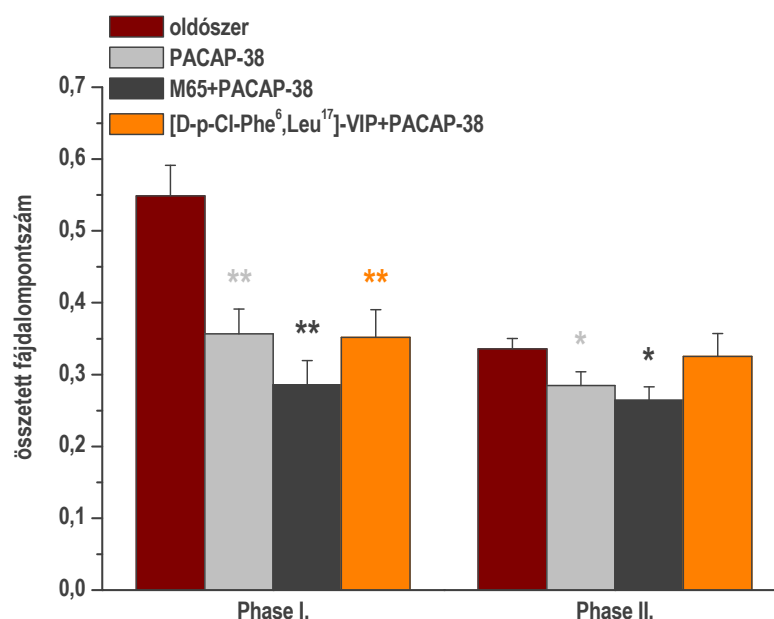
A termális és mechanikai hiperalgésia/allodinia adatait Dunnett-féle poszt tesztel kiegészített egyutas ANOVA-tesztel értékeltük. Az elektrofiziológiával nyert adatokat kétutas ANOVA-tesztel értékeltük ki. A formalin és vonaglasi tesztek értékelését Student-féle t-próbával végeztük. Minden esetben a különböző csoportok közötti eredmények összehasonlításakor * $p < 0.05$ és ** $p < 0.01$ értékeket határoztuk meg szignifikánsnak.

3. EREDMÉNYEK

Intraplantáris PACAP-38 hatása a formalinnal kiváltott akut nocifenzív viselkedésre

Az első, 5 perces fázisban a nocifenzív viselkedést jelző összetett fájdalompontszám a kontroll csoportban 0.55 ± 0.04 -nek adódott, míg az intraplantáris PACAP-38-kezelést kapott csoportban szignifikánsan kisebb, 0.36 ± 0.04 volt. A második fázisban az akut gyulladásos folyamatok következtében kialakuló nocifenzív viselkedést szintén szignifikánsan gátolta a lokálisan alkalmazott PACAP-38, a kontroll csoport 0.34 ± 0.02 pontszámával összehasonlítva az érték 0.28 ± 0.02 volt (22.ábra).

A PAC1 receptor-szelektív antagonistá M65-előkezelés nem befolyásolta a PACAP-38 gátló hatását, az első fázisban 0.29 ± 0.03 , a második fázisban 0.26 ± 0.02 lett az összetett fájdalompontszám. A VPAC1/VPAC2 receptor antagonistá [D-p-Cl-Phe⁶,Leu¹⁷]-VIP sem csökkentette a PACAP-38 gátló hatását a direkt kemonociceptív fázisban, az összpontszám 0.35 ± 0.04 -nek adódott, ezzel szemben szinte teljesen megszüntette az antinociceptív hatást az akut gyulladás fázisában (22.ábra).



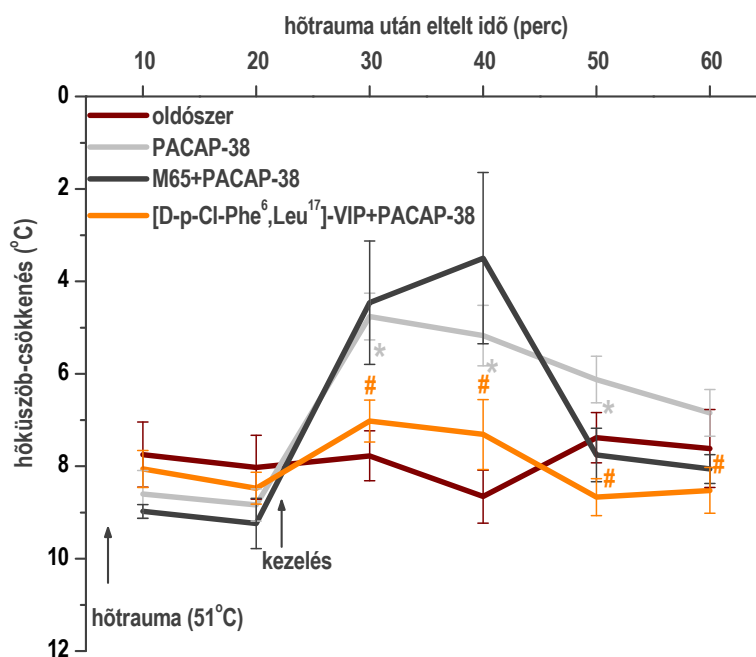
22.ábra: Intraplantáris PACAP-38 hatása a formalinnal kiváltott akut nocifenzív viselkedésre

(az oszlopok $n=10-16$ mérés/csoport átlagait \pm S.E.M. mutatják, ahol * $p<0.05$ és ** $p<0.01$ az oldószerrel kezelt csoporthoz viszonyítva)

Intraplantáris PACAP-38 hatása enyhe hőtraumával kiváltott termális hiperalgéziára

Az állatok átlagos kontroll hőküszöbe $42.8 \pm 0.2^\circ\text{C}$ volt. Az 51°C -os enyhe hőtrauma utáni 10. és 20. percben mért hőküszöbök jelentősen lecsökkentek, átlagosan $34.4 \pm 0.6^\circ\text{C}$ értékre. Az oldószerrel kezelt csoportban ez a $8-9^\circ\text{C}$ -os termális hiperalgézia a 60 perces kísérleti periódus alatt végig szinte változatlanul fennmaradt. A PACAP-38 talpba történő adása az utolsót kivéve minden mérési időpontban szignifikánsan, átlagosan 50%-kal gátolta a hőtraumával kiváltott hiperalgéziát, ami $4.5-6.5^\circ\text{C}$ -os küszöbcsökkenésben nyilvánult meg (23.ábra).

A PAC1 receptor antagonist M65 kódjelű vegyülettel történő előkezelés hatására nem változott a PACAP-38 antihiperalgéziás hatása egyik mérési pontban sem, ebben a csoportban szintén átlagosan 50%-os gátlás, vagyis csupán $4.5-5^\circ\text{C}$ -os hőküszöb-csökkenés mutatkozott. A VPAC1/VPAC2 receptor-antagonista [D-p-Cl-Phe⁶,Leu¹⁷]-VIP ezzel szemben minden mérési időpontban szignifikánsan nagyobb, $7-8.5^\circ\text{C}$ -os küszöbcsökkenést váltott ki, tehát megszüntette a PACAP-38 termális hiperalgéziában kifejtett antinociceptív hatását (23.ábra).

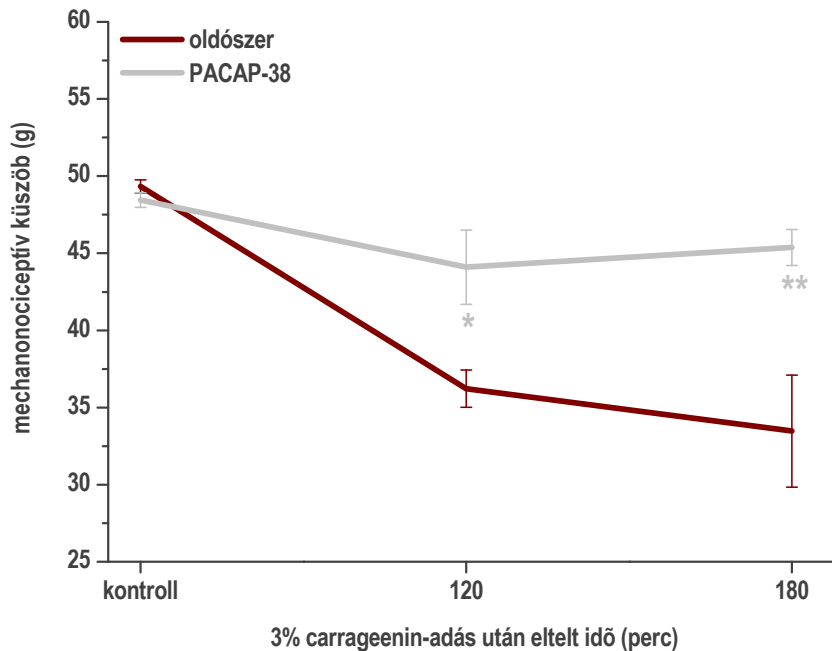


23.ábra: Intraplantáris PACAP-38 hatása enyhe hőtraumával kiváltott termális hiperalgéziára

(a mérési pontok $n=10-14$ mérés/csoport átlagait \pm S.E.M. mutatják, ahol $*p<0.05$ az oldószerrel kezelt csoporthoz viszonyítva és $\#p<0.05$ a PACAP-38-kezeléshez viszonyítva)

Intraplantáris PACAP-38 hatása a carrageeninnel kiváltott mechanikai allodiniára

A carrageenin hatására az oldószerrel kezelt állatoknál a 2. órában $26.5 \pm 4.2\%$ -os, a 3. órában $26.2 \pm 4.2\%$ -os mechanonocéptív küszöbcsökkenést tapasztaltunk. A mérések előtt 5 perccel PACAP-38-al kezelt állatokban azonban mindkét mérési időpontban szignifikánsan kisebb küszöbcsökkenést tapasztaltunk: a 2. órában $9 \pm 2.7\%$, a 3. órában $6.3 \pm 2.2\%$ volt a mechanikai allodinia (24.ábra).



24.ábra: Intraplantárisan adott PACAP-38 hatása a carrageeninnel kiváltott mechanikai allodiniára (az oszlopok n=10 mérés/csoport átlagait \pm S.E.M. mutatják, ahol * $p < 0,05$ és ** $p < 0,01$ az oldószerrel kezelt csoporthoz viszonyítva)

Intraplantáris PACAP-38 hatása a mechano- és termonocéptív küszöbökre patkányban

A talp mechanikai fájdalomküszöbe 46.6 ± 1.5 gramm volt $100 \mu\text{l}$ $2 \mu\text{M}$ PACAP-38 lokális beadása előtt és 44.1 ± 1.5 gramm 10 perccel utána. A láb hőküszöbe $42.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$ -nak adódott PACAP-adás előtt és $42.3 \pm 0.4^\circ\text{C}$ -nak 10 perccel adás után. Az eredményekből jól látszik, hogy a PACAP-38 e dózisa önmagában nincs hatással a nociceptív küszöbökre.

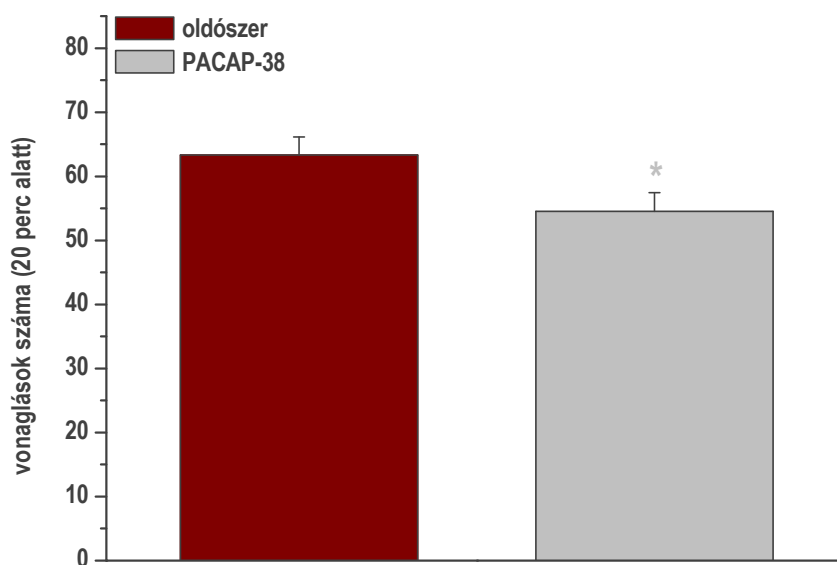
A PACAP-38 perifériás hatása az akut viscerális kemonocéptióra

A hasüregbe injektált ecetsav akut izgató hatására a kontroll csoportban az egerek a 20 perces vizsgálati periódus alatt 63.3 ± 2.8 vonaglást végeztek. Szubkután injektált PACAP-38 hatására azonban

ez a viscerális kemonocifenzív viselkedés 54.5 ± 2.9 vonaglásra csökkent, tehát a PACAP e modellben egérben is antinociceptív hatást fejtett ki (25.ábra).

A PACAP-38 hatása neuropátiás mechanikai hiperalgéziára

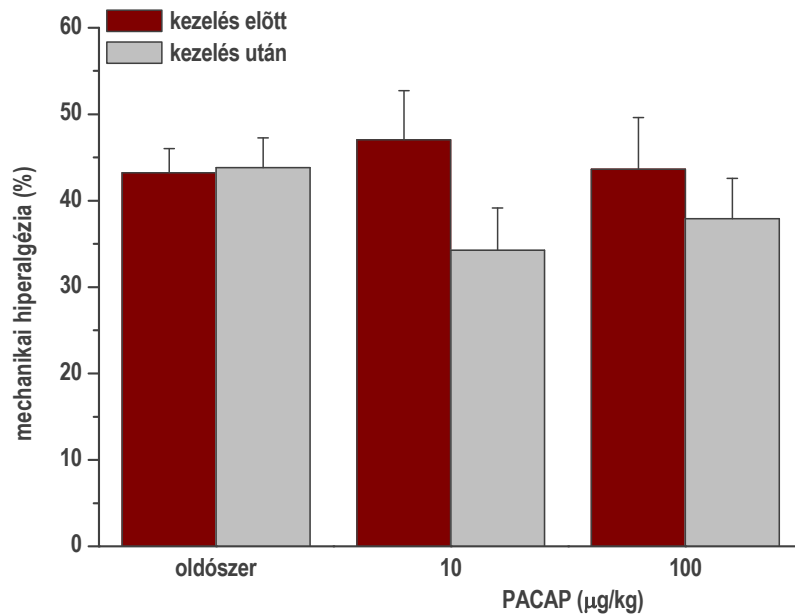
A műtétet követő 7. napon 43-47%-os mechanikai hiperalgézia alakult ki az egerek talpában, amelyet i.p. adott PACAP-38 egyik dózisa sem volt képes szignifikánsan csökkenteni, így ebben a modellben a PACAP hatástalannak bizonyult (26.ábra).



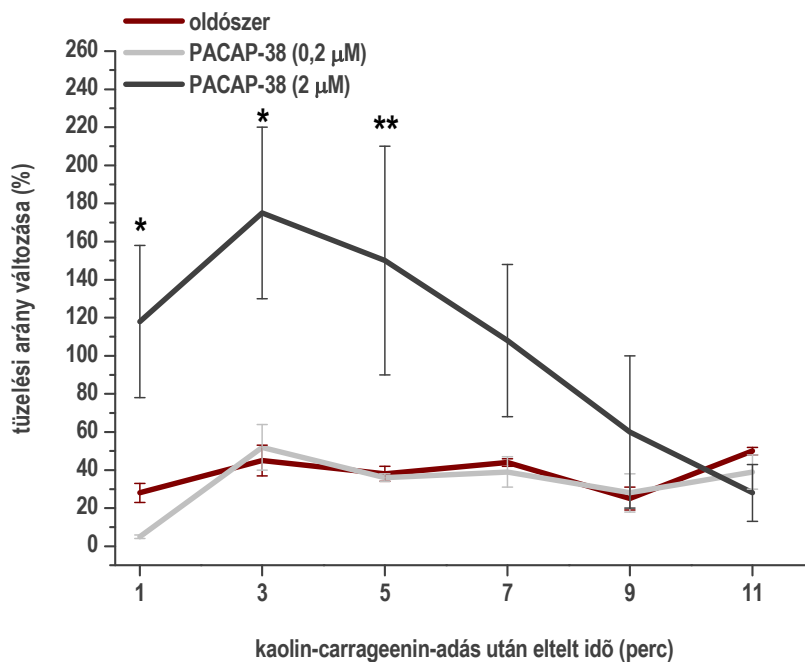
25.ábra: A PACAP-38 perifériás hatása az akut viscerális kemonocicepcióra
(az oszlopok $n=10-11$ mérés/csoport átlagait \pm S.E.M. mutatják, ahol $*p<0.05$ az oldószerrel kezelt csoporthoz viszonyítva)

A PACAP-38 perifériás hatása a gyulladt térdízület afferens aktivitására

A kaolin-carrageenin-injekció hatására a térdízület átmérője szignifikánsan megnövekedett ($p<0.001$, egymintás Student t-próbával). Állatonként 1-3, összesen 28 afferens rostot vizsgáltak. Az afferens tüzelés kiváltásához szükséges rotációs küszöb 4-17 mNm volt, a regisztrált rostok vezetési sebessége 0.78 és 2.20 m/s közé esett, így az összes vizsgált rostot a IV típusú térdízületi primér afferensek csoportjába sorolhattuk. A vizsgált rostokban $2 \mu\text{M}$ PACAP-38 lokális adása átmeneti, de szignifikáns aktivitás-fokozódást okozott. Ez a szenzitizáló hatás koncentrációfüggő, mivel a kisebb, $0.2 \mu\text{M}$ koncentráció nem okozott mechanoszenzitivitás-változást az ízületi afferenseken (27.ábra).



26.ábra: A PACAP-38 hatása neuropátiás mechanikai hiperalgeziára (az oszlopok n=6-8 mérés/csoport átlagait ± S.E.M. mutatják)



27.ábra: A PACAP-38 perifériás hatása a gyulladt térdizület afferens aktivitására (a mérési pontok n=7-9 mérés/csoport átlagait ± S.E.M. mutatják, ahol *p<0.05 az oldószerrel kezelt csoporthoz viszonyítva)

4. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

Bár a PACAP-38 jelenlétét a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronokban korábban több fajban is leírták (Moller et al. 1993; Mulder et al. 1994), csupán néhány meglehetősen ellentmondó adat utal a nociceptív folyamatokban betöltött szerepére, kizárólag a központi idegrendszeri hatásokra fókuszálva. Számos kísérletben tapasztalták a közvetlenül a központi idegrendszerbe (intracerebroventrikulárisan, intratekálisan) injektált PACAP-38 eltérő hatásait a nocicepció közvetítésében (Zhang et al. 1996; Dickinson & Fleetwood-Walker 1999; Said 2000; Shimizu et al. 2004). Néhány munkacsoport azt találta, hogy a PACAP-27 vagy a PACAP-38 intratekális adása a motoros funkciók megzavarása nélkül csökkentette a formalinnal kiváltott nocifenzív választ (Yamamoto & Tatsuno 1995; Zhang et al. 1996). Mások ezzel szemben a PACAP pronociceptív hatását mutatták ki egér tail flick tesztben (Narita et al. 1996). Patkányokban a PACAP csökkentette a termális stimuláció hatására létrejövő lábemelési reakció latenciaidejét, valamint fokozta a gerincvelő hátsó szarvába közvetített nocicepciót (Ohsawa et al. 2002). A PACAP intratekális adását követően a korai fázisban megnőtt a termális stimulus kiváltotta reakcióidő, a későbbiekben azonban nőtt a farok emelgetésének és nyalogatásának száma (Shimizu et al. 2004).

Jelen kísérletsorozatunk szolgáltatja az első eredményeket a PACAP hatásairól a perifériás nocicepcióval kapcsolatban. Jelen kísérletekkel bizonyítottuk, hogy a perifériásan adott PACAP-38 gátolja az akut szomatikus és viscerális kemonocicepciót, a gyulladással mechanikai allodiniát, és az enyhe hőtraumával kiváltott termális hiperalgéziát mind patkányban, mind egérben. Ugyanakkor nem befolyásolja a mechanikai hiperalgéziát traumás neuropátia egérmodelljében, sőt fokozza a gyulladt térdízületben a mechanikai stimulációval kiváltott afferens aktivitást.

A PACAP $G_{s/q}$ -proteinhez kapcsolt receptorok fejtik ki hatásukat, a PAC1-hez a PACAP jelentősen nagyobb affinitással kötődik, mint a VIP, míg a VPAC1/VPAC2 iránt mindkét neuropeptid ugyanakkora affinitással rendelkezik (Vaudry et al. 2000; Somogyvári-Vígh & Reglődi 2004; Laburthe et al. 2007). A PAC1 receptorok jelenlétét kimutatták neuronokon és simaizomsejteken (Ekblad 1999; Seebeck et al. 2002; Hernandez et al. 2004). A VPAC1/VPAC2 receptorok expresszálódnak a gerincvelőben, a hátsó gyöki ganglionokban, a térdízületi afferenseken, gyulladással és immunsejteken (Takeba et al. 1999; Vaudry et al. 2000; McDougall & Barin 2005). Bár e receptorok számos szignáltranszdukciós mechanizmushoz, például adenilát cikláz-aktiváláshoz és következményes cAMP-koncentráció fokozódáshoz, foszfolipáz C-stimulációhoz, inozitol-triszfoszfát (IP_3) által közvetített Ca^{2+} -felszabaduláshoz, Ca^{2+} - és diacil-glicerol-függő protein kináz C (PKC) aktivációhoz, valamint nitrogén-

monoxid (NO) szintézis stimulációhoz (Makhlouf & Murthy 1997; Vaudry et al. 2000) kapcsolnak, mindegyik folyamat neuronális aktivációhoz vezet. Ez a direkt mechanizmus jól alátámasztja az ízületi afferenseken elektrofiziológiai vizsgálattal nyert direkt szenzitizáló hatást. Ezzel szemben a perifériás antinociceptív hatások, amelyet több kísérleti modellben is tapasztaltunk, nagy valószínűséggel nem direkt az idegvégződésen való hatás eredményei, de eddig még nem ismert gátló receptor létezése sem zárható ki a bőrben/peritoneumban lévő afferenseken.

Az adjuvánssal kiváltott gyulladás hatására a hátsó gyöki ganglionban nagymértékben upregulálódó PACAP-nak potenciális szerepet tulajdonítottak a gyulladásos fájdalom folyamataiban (Zhang et al. 1998). A PACAP modulálja a gyulladásos és immunfolyamatokat is, a vizsgálatok jelentős része gyulladásgátló hatását igazolta (Ganea & Delgado 2002; Abad et al. 2006). Egérben i.p. adva a PACAP számos gyulladásos faktor hatásának modulálásával csökkentette a kollagénnel kiváltott ízületi gyulladásos elváltozásokat, a lábduzzadást, a bőr gyulladását, és a gyulladásos sejtek mennyiségét (Abad et al. 2001). Gyulladásgátló hatását számos tanulmány magyarázza azzal, hogy a PACAP képes gátolni gyulladásos citokinek ($TNF\alpha$, IL-6, IL-12), kemokinek, transzkripciós faktorok és egyéb mediátorok, például NO termelését (Leceta et al. 2000; Martinez et al. 2002; Delgado et al. 2003; Kojima et al. 2005). A PACAP gátolja továbbá a T-sejtek proliferációját, számos makrofág-funkciót, például a cAMP-függő, VPAC1 receptor aktiválta kemotaxist (Delgado et al. 1999a, b). Korábban a mi munkacsoportunk is kimutatta, hogy gyulladásos folyamatokban nem csak a nem-neurogén sejt, hanem az akut neurogén eseményeket is képes gátolni a PACAP szisztémás adása. Csökkentette a mustárolajjal, a kapszaicinnal vagy a reziniferatoxinnal kiváltott plazmafehérje-kiáramlást patkány lábhati bőrében, valamint a mustárolajjal kiváltott fülödémát egérben (Németh et al. 2006; Helyes et al. 2007). Ezen kívül direkt *in vitro* bizonyítékokat szolgáltatunk arra, hogy a PACAP-38 gátolja proinflammatorikus szenzoros neuropeptidek (P-anyag és CGRP) felszabadulását a kapszaicin-érzékeny szenzoros rostok perifériás végződéseiből, ami magyarázza kizárólag neurogén eredetű plazmaprotein-extravazációra gyakorolt gátló hatását (Helyes et al. 2007). Ezek a szenzoros neuropeptidek részt vesznek a nociceptív folyamatokban, valamint a gyulladásos hiperalgézia/allodinia kialakulásában is (Uddmann et al. 1998; Riedel & Neeck 2001).

A PACAP-38 kísérleteinkben tapasztalt antinociceptív és antihiperalgézikus hatásainak pontos celluláris mechanizmusa nem ismert, kísérleteinkben PAC1 és VPAC1/VPAC2 receptorokon ható antagonistákkal egyértelműen kimutattuk, hogy a formalin teszt második fázisában, valamint a hőtraumával kiváltott termális hiperalgéziában tapasztalt gátló PACAP-hatások VPAC receptoron keresztül valósulnak meg. Valószínűleg nem a nociceptoron kifejtett direkt hatásról van szó, ezek a receptorok ugyanis G_s - és G_q -fehérjékhez kötötten működnek, vagyis különféle szignáltranszdukciós útvonalakhoz kapcsolódva növelik az intracelluláris cAMP-, valamint a Ca^{2+} -szintet (Vaudry et al. 2000;

Laburthe et al. 2007), vagyis neuronális stimulációt okoznak (Taiwo & Levine 1991; Taiwo et al. 1992; Spengler et al. 1993). Ugyanakkor hízósejtekben, makrofágokban és granulocitákban a megnövekedett cAMP-szint gátolja gyulladáshoz vezető mediátorok, citokinek felszabadulását (Kuehl et al. 1987; Weston & Peachell 1998). A PACAP akut gyulladásmoделlekben megfigyelt perifériás antinociceptív és antihyperalgézikus hatásait magyarázhatja a korábban már említett pronociceptív neuropeptidok, illetve egyéb fájdalomkeltő és szenzitizáló hatású molekulák (bradikinin, prosztaglandinok, leukotriének) sejtekből való felszabadulásának gátlása. Az a megfigyelésünk, hogy a lokálisan adott PACAP-38 önmagában nem befolyásolta sem a mechanikai, sem a termális nociceptív küszöböt, arra utal, hogy nincs hatással a feszültségfüggő Na⁺-csatornákra, vagyis az általa kifejtett perifériás antinocicepcióban helyi érzéstelenítő-szerű hatás nem játszik szerepet.

A formalin közvetlenül aktiválja az ankirin-ismétlődéseket nagy számban tartalmazó TRPA1 receptort, amely az I. fázisban létrejövő kemonocifenzív reakcióért felelős (Macpherson et al. 2007). Ebben a fázisban kiugróan nagy mértékű antinociceptív PACAP-hatást mértünk. Ezt a hatást nem szüntette meg sem a PAC1 receptorra szelektív, sem a VPAC receptorokon ható antagonistákkal történő előkezelés, tehát ebben az esetben nem ezeken a receptorokon keresztül megvalósuló gátló hatásról beszélhetünk. Nem zárható ki ugyanakkor más, eddig ismeretlen gátló PACAP receptor létezése, más receptorokon (kannabinoid, opioid, esetleg szomatosztatin) kifejtett hatás (Muller et al. 2007), valamint akár a PACAP TRPA1 receptort negatívan moduláló vagy antagonizáló képessége sem.

A PACAP-38 viscerális és szomatikus nocicepcióban megfigyelt gátló hatásával ellentétben patkány gyulladt térdízületi afferensein végzett elektrofiziológiai mérések szenzitizáló hatást bizonyítottak. Ezen eredmények összhangban állnak korábbi adatokkal, melyek a VIP ízületi nocicepcióban betöltött szerepét vizsgálták. Lokálisan beadott VIP, a PACAP-hoz hasonlóan, szenzitizálta az ízületi primér afferenseket, amely VPAC receptor antagonistával gátolható (McDougall et al. 2006; Schuelert & McDougall 2006). A PACAP-38 aktiválja az ízületi tokban lévő szenzoros érzőideg-végződéseken található VPAC1/VPAC2 receptorokat is, ami az ízület mechanoszenzitivitásának fokozódásához vezet. A szenzitizáló hatás alapja a megemelkedett intracelluláris cAMP-szint, ami az adenilát cikláz, valamint a PKA aktiválásának következménye, de szerepe lehet a foszfolipáz C aktiválásának is e folyamatban (Taiwo & Levine 1991; Taiwo et al. 1992; Spengler et al. 1993). Humán mintákban kimutatták a VPAC receptort szinoviocitákon is (Takeba et al. 1999), amik speciálisan az ízületben jelen lévő makrofág- és fibroblaszt-szerű sejtek, és amelyek gyulladáshoz vezető mediátorok, prosztaglandin E₂, IL-1 és TNF α szekréciójára képesek (Zheng et al. 2006). A szinoviális hízósejtekből felszabadul emellett hisztamin is, ami szintén fokozza az algogén hatást (Herbert et al. 2001). Ismert tény, hogy a VIP képes hízósejt-degranulációt kiváltani (Skofitsch et al. 1983), de nem zárható ki a PACAP szinoviocitákat és hízósejteket indirekt módon aktiváló hatása sem (McDougall & Barin 2005).

Egértaliban és egérízületben kiváltott gyulladást vizsgáló kísérleteinkben a PACAP eltérő, látszólag ellentmondásos szerepét magyarázhatjuk egyrészt az egyes szervekben működő eltérő másodlagos messenger mechanizmusokkal, eltérő receptor-expresszióval, másrészt a különböző gyulladáskeltő anyagok által kiváltott eltérő gyulladási folyamatokkal, amelyek különböző gyulladási sejteket és gyulladási mediátorokat aktiválnak. A talpban tapasztalt gátló hatások minden bizonnyal az ízületben is jelentkeznek, itt azonban valószínűleg a direkt neuronális izgatás, valamint a speciálisan csak az ízületben jelen lévő szinovociták aktivációja dominál.

Nem találtunk eltérést a mechanikai hiperalgéziában a PACAP szisztémás adását követően egér mononeuropátiás modellben annak ellenére, hogy elektrofiziológiai bizonyítékok vannak arra vonatkozóan, hogy a PACAP és a VIP növeli a hátsó szarv neuronok aktivitását patkány mononeuropátiában (Dickinson & Fleetwood-Walker 1999). Hasonlóképpen, egy másik munkacsoport szerint PACAP-hiányos egerekben nem alakult ki neuropátiás termális hiperalgécia, mechanikai allodinia, vagyis feltételezhetően szükség van a PACAP-ra neuropátiás fájdalom kialakulásában (Mabuchi et al. 2004). Ezeket a különbségeket a PACAP periférián adott válaszaival magyarázhatjuk, hiszen ez a 38 aminosavból álló polipeptid elég nagy ahhoz, hogy intraperitoneális adást követően ne tudjon bejutni a központi idegrendszerbe.

Összefoglalva tehát elmondható, hogy ezek a kísérletek igazolják elsőként a periférián a PACAP-38 jelentős szerepét a fájdalomérzet közvetítésében. Ezek a hatások azonban a nociceptív folyamatok patomechanizmusától függően eltérőek lehetnek: a nociceptorokon kifejtett közvetlen hatás stimuláló, szenzitizáló, bizonyos gyulladási folyamatokban azonban antinociceptív, antihiperalgécikus, antiallodiniás hatást tapasztaltunk, amelyet a VPAC receptorok közvetítenek. A PACAP perifériás nocicepcióban betöltött szerepének pontos molekuláris mechanizmusainak felderítéséhez további vizsgálatok szükségesek.

III. FEJEZET

A SZTATIKUS MÁGNESES TÉR ANTINOCICEPTÍV HATÁSA ÉS A HÁTTÉRBE ÁLLÓ MECHANIZMUSOK VIZSGÁLATA

A fejezet alapjául szolgáló közlemény:

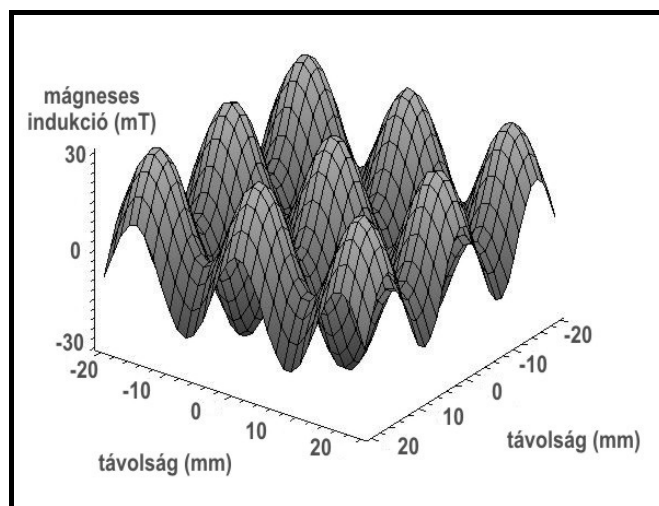
K. Sándor, Zs. Helyes, K. Gyires, J. Szolcsányi, J. László: **Static magnetic field-induced anti-nociceptive effect and the involvement of capsaicin-sensitive sensory nerves in this mechanism.**
Life Sciences 81(2): 97-102. 2007

1. BEVEZETÉS

Számos korábbi eredmény igazolta a sztatikus mágneses tér (static magnetic field, SMF) hatásait különböző viselkedésmintázatokban és idegi működésekben, a lokomotoros aktivitás indukációjában (Haupt et al. 2003), kondicionált ízaverzióban (Nolte et al. 1998) vagy vesztibuláris aktivációban (Snyder et al. 2000). A sztatikus mágneses tér nociceptív folyamatokra gyakorolt hatásáról szóló kísérletek eredményei meglehetősen ellentmondásosak. Néhány tanulmány arról számol be, hogy rövid időre mágneses térbe helyezett egérben csökken a morfin- és stressz-indukálta analgézia (Kavaliers et al. 1984; Choleris et al. 2002) és nő a fájdalmas hőre való érzékenység (Del Seppia et al. 2003). Mások ettől eltérően azt találták, hogy a sztatikus mágneses térnek nincs hatása a nocicepcióra és a fájdalmas kórképekre emberben (Hong and Shellock 1990; Reeser et al. 2005). Arra is van azonban adat, hogy a sztatikus mágneses tér antinociceptív hatásokkal rendelkezik különböző egérmodellekben (Shupak et al. 2004; Prato et al. 2005). Az ellentmondó eredmények magyarázata lehet, hogy a kísérleteket különböző fajokon végezték, valamint hogy a kiváltott hatás függhet a mágneses tér eltérő tulajdonságaitól, másképpen beállított paramétereitől és a behatás időtartamától is.

Az általunk használt sztatikus mágneses teret létrehozó készüléket dr. László János (MTA Matematikai Tudományok Osztálya) és munkacsoportja készítette, optimalizálta és validálta egér vonaglasi tesztben (László et al. 2007). A készülékben alul és felül elhelyezkedő mátrixok 5 mm sugarú, 10 mm magasságú, henger alakú neodímium-vas-bór (NdFeB) összetételű mágneseket tartalmaznak. Ezek a ritkaföldfém mágnesek rendelkeznek a legmagasabb indukció/tömeg aránnyal. Az egyedi mágnesek N50 fokúak, azaz jellemző értékeik az 1.47 T értékű remanens mágneses indukció, a 373-406 kJ/m³ tárolt energiasűrűség és a 80°C maximális működési hőmérséklet. Minden egyes mágnes a szomszédaival ellentétes polaritású, továbbá a másik mátrixban vele szemben elhelyezkedő mágnessel egy tengelyű és megegyező irányú, ami a mágneses mező jellegzetes mintázatához vezet (28.ábra). Az így létrejött mágneses térre, amit 12.3 mV/T érzékenységgű Hall-szenzorral ellenőriztek, a továbbiakban az optimalizált sztatikus mágneses tér (oSMF) elnevezést használjuk (László et al. 2007).

A pontos mechanizmus, amellyel az SMF változatos hatásait kiváltja, egyelőre ismeretlen (Lockwood et al. 2003; Saunders 2005), bár felmerült az endogén opioiderg rendszer és egyes ioncsatornák vezetőképességének megváltoztatásának szerepe (Kavaliers & Ossenkopp 1994; Rosen 1996, 2003). Számos eredmény alapján feltételezhető, hogy a gyenge sztatikus mágneses tér csökkenti az ideg ingerületvezetésének sebességét a Ca²⁺- és Na⁺-csatornák gátlásán keresztül (Rosen 1996; Wieraszko 2000; Rosen 2003).



28.ábra: A mágneses tér eloszlásának sematikus ábrája (László et al. 2007 nyomán)

A kapszaicin-érzékeny, TRPV1 receptort expresszáló szenzoros neuronok rendkívül fontos szerepet játszanak számos gyulladáshoz és fájdalommal járó folyamat kialakulásában. E neuronok aktivált végződéseiből olyan szenzoros neuropeptidok szabadulnak fel, mint a P-anyag vagy a CGRP, amelyek a központi idegrendszerben és a periférián is jelentős pronociceptív, proinflammatorikus hatásokkal rendelkeznek (Maggi 1995; Szolcsányi 2004). Ezzel szemben, az ugyanezen idegvégződésekből felszabaduló szomatostatin a szisztémás keringésbe jutva a test távolabbi pontjain képes gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatást kifejteni. A TRPV1 receptor olyan nem-szelektív kationcsatorna, amelyet számos inger, például exogén vanilloidok (kapszaicin vagy reziniferatoxin), fájdalmas hőmérséklet, protonok és endogén anyagok (bradikinin, leukotriének, lipoxigenáz termékek) képesek aktiválni (Szolcsányi 2004; Szállási et al. 2006). Ismételt, nagy dózisu TRPV1 receptor agonistával (kapszaicin vagy RTX) történő előkezeléssel a kapszaicin-érzékeny neuronok működése szelektíven gátolható, ez a deszenzibilizáció (Bevan & Szolcsányi 1990; Szolcsányi 1993; Helyes et al. 2003). Ez a funkciókiesés hosszú időn keresztül fennmarad, ezért e módszer segítségével e szenzoros rostok különféle fiziológia, patofiziológiai folyamatokban betöltött szerepe vizsgálható. A TRPV1 receptor tartós aktivációja következtében jelentős mértékben megnövekedik az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció, ami a mitokondriumokban Ca^{2+} -felhalmozódáshoz és következményes duzzadáshoz vezet, a sejtműködés károsodását is okozva (Szállási et al. 1989). A folyamat mechanizmusát az általános bevezetőben már ismerttettem és szemléltettem (1.ábra).

Kísérleteinkben az oSMF hatásait vizsgáltuk akut viscerális és szomatikus kemonocicepcióra, akut gyulladáshoz nocifenzív reakciókra és mechanikai hiperalgéziára. Vizsgálatsorozatunk másik része a megfigyelt antinociceptív, antihiperalgéziás hatás mechanizmusának és a kapszaicin-érzékeny szenzoros rostok ezen folyamatokban betöltött szerepének vizsgálatára irányult.

2. KÍSÉRLETI MODELLEK, VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

Állatok

A kísérleteket 20-25 g-os hím Balb/c, illetve CFLP egereken végeztük. Előbbieket a Pécsi Tudományegyetem Központi Állatházában, utóbbiakat a Semmelweis Egyetem Állatházában standard, apatogén körülmények között tartottuk, étellel és vízzel *ad libitum* ellátva.

Kísérleteink minden esetben megfeleltek az állatkísérletek végzéséről szóló 243/1998. számú kormányrendelet előírásainak, és igazodnak a fájdalom tanulmányozására létrehozott nemzetközi tanács javaslataihoz (Zimmermann 1983). A kísérleti eljárásokat a Pécsi Tudományegyetem állatkísérletekkel foglalkozó Etikai Bizottsága (engedélyszám: BA 02/2000-16-2006), valamint a budapesti Semmelweis Egyetem Állatetikai Bizottsága (engedélyszám: 1810/003/2004) engedélyezte.

Optimalizált sztatikus mágneses tér

A sztatikus mágneses teret létrehozó készüléket egy ferromágneses anyagból készült keret, és egy abba illeszkedő, 140*140*46 (hosszúság*szélesség*magasság) mm kiterjedésű műanyag ketrec alkotja, amelyben az egerek szabadon mozognak. A bevezetőben részletesen jellemzett mágneses mátrixok a keretben, a ketrec alatt és felett helyezkednek el (László et al. 2007).

Vonaglási teszt

A viscerális nocicepciót hím CFLP egereken váltottuk ki 200 µl 0.6%-os ecetsav-oldat, illetve 2%-os MgSO₄-oldat intraperitoneális adásával (Witkin et al. 1961). A peritoneum kémiai izgatására adott tipikus nocifenzív reakció az alhasi izmok összehúzódása, az úgynevezett vonaglás. A vonaglásokat az anyagadástól számított 0-5, 5-20 és 20-30 perces intervallumokban külön-külön számoltuk. Egy kísérlet során két vagy három egeret tettünk egyszerre egy-egy ketrecbe a kísérlet előtt 5 perccel, és ott is tartottunk végig a teljes kísérlet alatt.

Az egyik ketrecet optimalizált mágneses térbe helyeztük, a másikat kontrollként használtuk.

Reziniferatoxinnal kiváltott mechanikai hiperalgésia

Balb/c egerek bal hátsó lábának talpába injektáltunk 20 µl 0.1 µg/ml TRPV1 receptor agonista RTX-oldatot. A jobb talpat kontrollként használtuk. Méréseinket az RTX-injekció előtt és 30 perccel utána végeztük. A talp mechanikai érintési érzékenységét Ugo Basile Dynamic Plantar Aesthesiometerrel (Olaszország) mértük. A metodika részletes leírása az I. Fejezet Kísérleti modellek, vizsgálati

módszerek részében megtalálható. Ez a módszer az egyik legmegfelelőbb egérben a mechanikai hiperalgémia mértékének megítélésére (Bölcskei et al. 2005). A hiperalgémia a kezdeti kontroll értékekhez viszonyítva százalékban fejeztük ki.

Az egyik csoport állatait RTX-adás előtt 5 perccel az oSMF-be helyeztük és mérésig ott is tartottuk, a másik csoport állatait nem tettük ki a sztatikus mágnes tér hatásainak.

Formalinnal kiváltott akut nocifenzív viselkedés vizsgálata

Balb/c egerek bal hátsó lábába intraplantárisan 50 µl 2.5%-os formalin-oldatot injektáltunk. A formalin két fázisban vált ki nocifenzív reakciót az állatokban, elsőként egy direkt kemonociceptív hatás jelentkezik, ami körülbelül 5 percig tart (I. fázis), utána pedig beindulnak a gyulladási folyamatok, amik a második fázist adják a 20-45. perces intervallumban (Tjolsen et al. 1992). A nocifenzív reakció mértékét mindkét fázisban a kezelt láb emelgetésének és nyalogatásának összesített ideje alapján határoztuk meg (Bölcskei et al. 2005).

Anyagadás előtt 5 perccel az állatokat az oSMF-be helyeztük, és ott is tartottuk a kísérlet végéig. Az oSMF-mérések mellett párhuzamosan kontroll méréseket is végeztünk, ahol az állatok nem voltak mágneses térben.

A kapszaicin-érzékeny afferensek inaktíválása reziniferatoxin-előkezeléssel

A kapszaicin-érzékeny primér szenzoros neuronok működését szelektíven lehet blokkolni az ultrapotens TRPV1 receptor agonista RTX nagy dózisainak ismételt adásával. Ekkor Balb/c egereknek 30, 70 és 100 µg/kg RTX-et adtunk szubkután, három egymást követő napon (Helyes et al. 2004). A kezelések alkalmával az állatok az akut hatásból adódó szövődmények kivédésére minden nap 0.1 ml/10 g egér dózisban injekciókóktélt kaptak intraperitoneálisan, aminek 1 milliliterében van 40 µl Bricanyl (0.5 mg/ml terbutalin-szulfát), 40 µl Diaphyllint (4.8%-os teofillin-etilén-diamin), 20 µl atropint (0.1%-os atropinum sulfuricum) és higítószerként fiziológiás NaCl-ot. Öt nappal az utolsó kezelést követően, amikor már nem kellett számolnunk az RTX akut izgató hatásaival, az állatokkal elvégeztük a fentebb leírt formalin tesztet, valamint vizsgáltuk a carrageeninrel kiváltott akut gyulladási mechanikai hiperalgémia vizsgálatát.

Carrageeninrel kiváltott gyulladási mechanikai hiperalgémia vizsgálata

Balb/c egerek bal hátsó lábának talpába 50 µl 3%-os carrageenin-oldatot injektáltunk, másik hátsó lábának talpát kontrollként használtuk. A carrageenin kevert típusú akut gyulladási reakciót vált ki a talpban, ami maximumát anyagadás után 3 órával éri el (Bölcskei et al. 2005). A méréseket ezért carrageenin-adás előtt és 3 órával utána végeztük. A mechanikai érzékenységet ennél a modellnél is

Ugo Basile Dynamic Plantar Aesthesiometerrel határoztuk meg. A hiperalgéziát a kezdeti kontroll értékekhez viszonyítva, százalékban fejeztük ki.

Az egyik csoport állatait carrageenin-adás előtt 5 perccel az oSMF-be helyeztük és a mérés végéig ott tartottuk, a másik csoport állatait nem tettük ki a sztatikus mágneses tér hatásának.

Rotarod teszt

Ugo Basile 7750 Accelerating Rotarod (Olaszország) készüléssel azt is megvizsgáltuk az egereken, hogy befolyással van-e az oSMF-expozíció az egerek koordinációjára és motoros működésére (Jones and Roberts 1968). A készülék három, egymással együtt forgó doból áll, amelyeken külön-külön egy-egy egeret lehet elhelyezni. Az állatok a dob tetején kapaszkodnak a készülék indításakor. A dob forgásának sebessége 20 másodpercenként emelkedik fokozatosan 4-ről 40 fordulat/perc sebességre. Az állatok igyekeznek forgás közben is a dob tetején megkapaszkodni. A mérésnek akkor van vége, amikor az állat leesik a dobról a készülék alatt található pedálra. Ezzel leállítja a dob számlálóját, amiről a mérés eredményét másodpercben olvashatjuk le. A rotarod tesztet elvégeztük az oSMF-ben való tartózkodás előtt és után, valamint a kontroll (sztatikus mágneses térnek nem kitett) csoportban is. Minden mérést háromszor ismételtünk meg és ezeknek az átlagait használtuk fel az eredmények értékeléséhez.

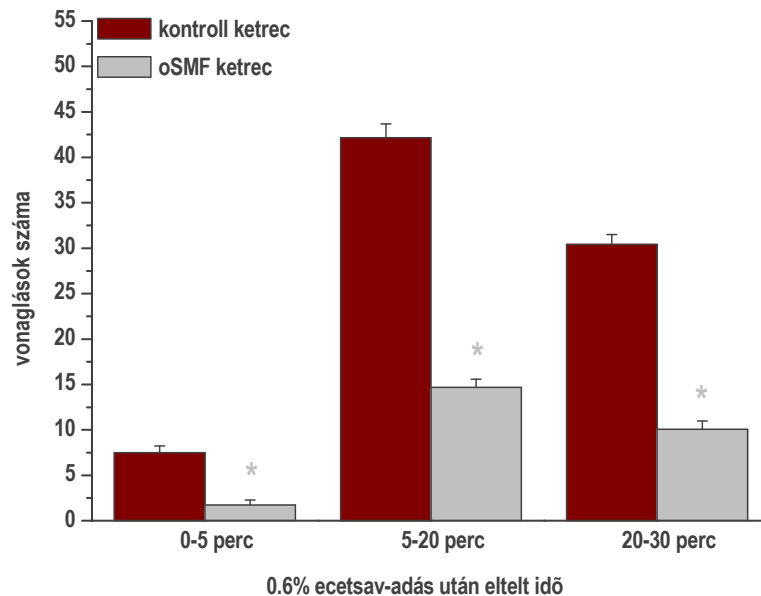
Statisztika

Mérési eredményeink értékeléséhez módosított Bonferroni t-teszttel kiegészített egyutas ANOVA-tesztet használtunk, ahol minden esetben a különböző csoportok közötti eredmények összehasonlításakor $*p < 0.05$ értékeket határoztuk meg szignifikánsnak.

3. EREDMÉNYEK

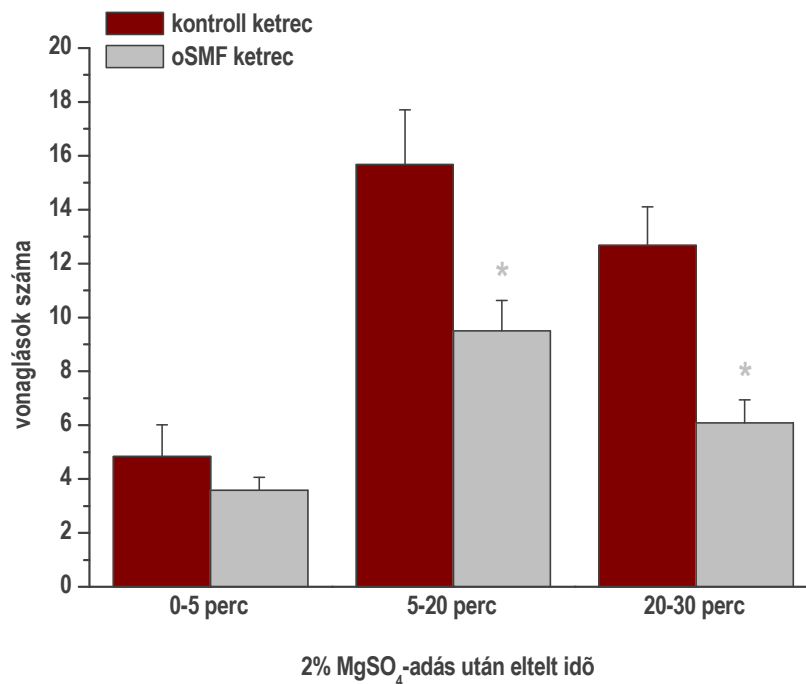
Az oSMF hatása az akut viszcerális kemonocicepcióra

Az i.p. injektált ecetsav hatására a kontroll ketrecben tartott állatok vonaglásának száma az első periódusban 7.5 ± 0.8 , a második periódusban 42.2 ± 1.5 , a harmadikban pedig 60.4 ± 1.1 volt. Jól látható, hogy az oSMF-ben lévő egerek vonaglásának száma ehhez képest rendre 77, 65 és 67%-kal volt alacsonyabb, ami mindhárom periódusban szignifikáns csökkenést jelent a kontrollhoz képest (29a.ábra).



29a.ábra: Az oSMF hatása az ecetsavval kiváltott akut viszcerális kemonocicepcióra
(az oszlopok n=6-12 mérés/csoport átlagait \pm S.E.M. mutatják,
ahol * $p < 0.05$ az optimalizált mágneses térbe nem helyezett csoporthoz viszonyítva)

A $MgSO_4$ -oldat i.p. injekciója kisebb mértékű nocifenzív reakciót okozott, mint az ecetsav. Az első szakaszban 4.8 ± 1.2 , a másodikban 15.7 ± 2.0 , a harmadikban pedig 12.7 ± 1.4 volt a vonaglások száma. Az oSMF hatására ezek az értékek szakaszonként megfelelően 26, 39 és 52%-kal csökkentek, ami a második és harmadik intervallumban szignifikáns gátlást jelent a kontroll értékekhez képest (29b.ábra).



29b.ábra: Az oSMF hatása a MgSO₄-tal kiváltott akut viscerális kemonocicepcióra
 (az oszlopok n=6-12 mérés/csoport átlagait ± S.E.M. mutatják,
 ahol *p<0.05 az optimalizált mágneses térbe nem helyezett csoporthoz viszonyítva)

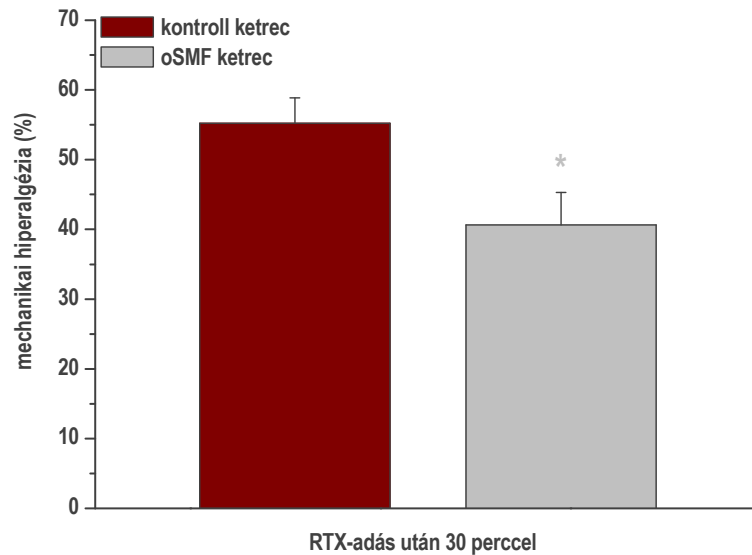
Az oSMF hatása a reziniferatoxinnal kiváltott mechanikai hiperalgégiára

A TRPV1 receptor agonista RTX intraplantáris injekciója kontroll állatokban fél órával a beadás után jelentős mértékben, 8.4 ± 0.2 grammról 3.6 ± 0.3 grammra csökkentette a mechanociceptív küszöböt, ami a kezdeti értékekhez képest 55%-os hiperalgéziát jelent. Ugyanez az RTX-adás az optimalizált sztatikus mágneses térben tartott állatokban 30 perc elteltével 40.6%-os fájdalomküszöbcsökkenést volt képes kiváltani, 8.0 ± 0.4 grammról csak 4.9 ± 0.4 grammra változtak a küszöbértékek. Az oSMF tehát szignifikánsan gátolta a TRPV1 receptor aktivációjával kiváltott mechanikai hiperalgéziát a talpban (30.ábra).

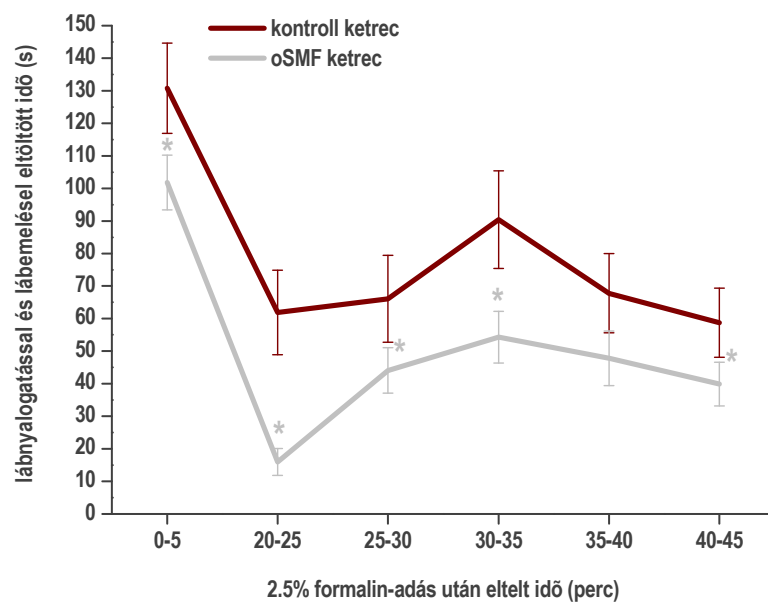
Az oSMF hatása a formalinnal kiváltott akut szomatikus nocicepcióra

A formalin teszt első fázisában (0-5 perc között) a kontroll csoportban lévő egerek nocifenzív viselkedése (lábnyalás+lábemelés) 130.8 ± 13.9 másodpercig tartott. Az oSMF-ben tartott állatoknál ez az érték szignifikánsan alacsonyabb, 101.8 ± 8.4 másodperc volt. A második fázisban, ami a 20. percben kezdődik és a 45. percre tart, 5 perces mérési szakaszokat különítettünk el. Az ábráról leolvasható, hogy a nocifenzív viselkedéssel eltöltött idő minden szakaszban jelentősen kisebb volt az oSMF-ben tartott állatoknál, mint a kontroll ketrecben lévőknél. Ez a jelentős különbség végig szignifikánsnak

mutatkozott egy mérési ponttól eltekintve, ahol bár a tendencia jól látható, a nagy standard hiba miatt az eltérés nem érte el a statisztikai próba szignifikanciai határértékét (31.ábra).



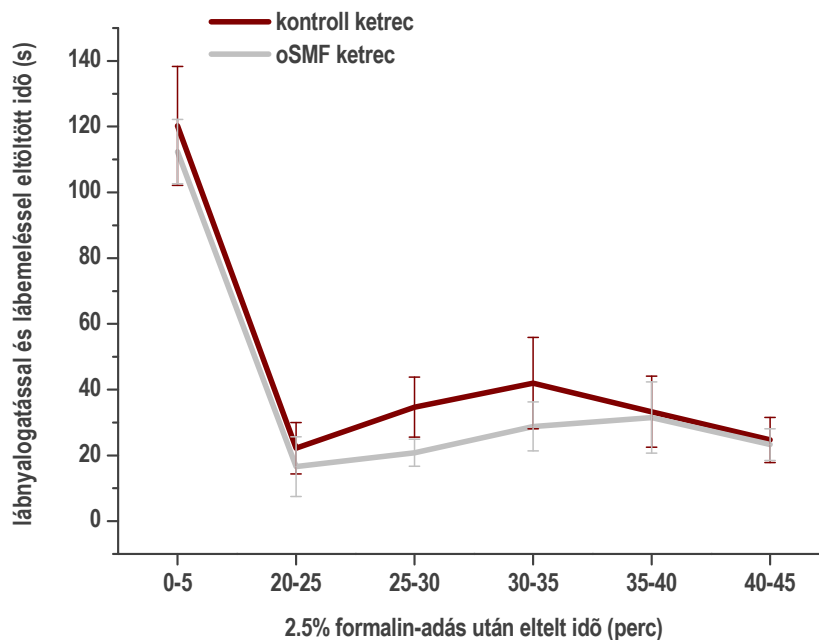
30.ábra: Az oSMF hatása a reziniferatoxinnal kiváltott mechanikai hiperalgeziára
(az oszlopok n=11 mérés/csoport átlagait \pm S.E.M. mutatják, ahol $*p < 0.05$ az optimalizált mágneses térbe nem helyezett csoporthoz viszonyítva)



31.ábra: Az oSMF hatása a formalinnal kiváltott akut szomatikus nocicepcióra
(a mérési pontok n=10 mérés/csoport átlagait \pm S.E.M. mutatják, ahol $*p < 0.05$ az optimalizált mágneses térbe nem helyezett csoporthoz viszonyítva)

Az oSMF hatása a formalinnal kiváltott akut nocifenzív viselkedésre RTX-előkezelt állatokban

Azoknál az állatoknál, amelyeknél RTX-előkezelést alkalmaztunk a kísérlet előtt 5 nappal, a kapszaicin-érzékeny afferensek működését inaktívtuk. Az ábrán látható, hogy a kontroll csoportban a korábbi kísérletsorozathoz hasonlóan alakul a nocifenzív viselkedés formalin hatására, az I. fázisban 120.2 ± 18.1 másodperc telt nocifenzív aktivitással, a II. fázisban pedig szakaszonként átlagban 22-42 másodperc. Az ábrán az is látható, hogy az oSMF előzőekben tapasztalt antinociceptív hatása a kapszaicin-érzékeny rostok inaktíválása után elmaradt, az RTX-szel deszenzibilizált állatokban mind az I. fázisban, mind a II. fázis összes mérési pontjában szinte a kontrollal megegyező értékeket kaptunk (32.ábra).



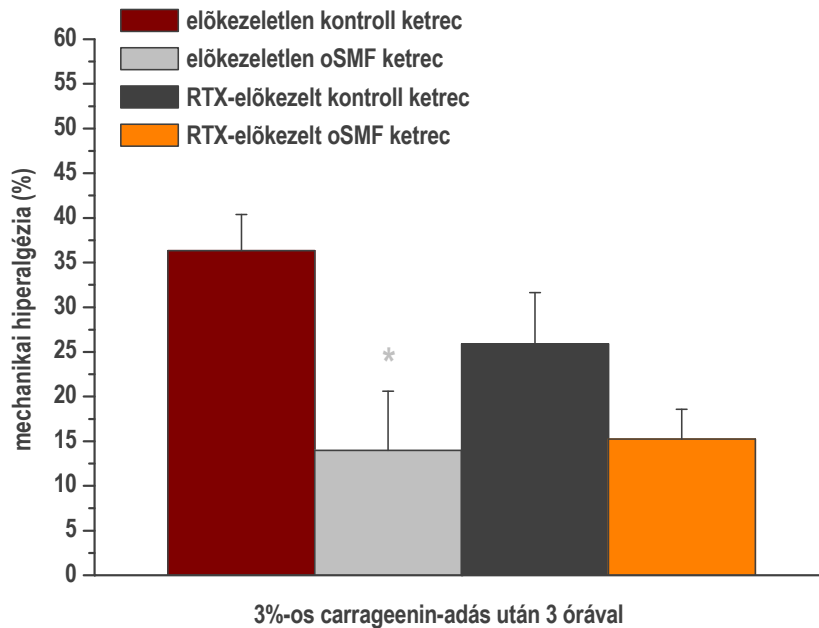
32.ábra: Az oSMF hatása a formalinnal kiváltott akut nocifenzív viselkedésre RTX-előkezelt állatokban

(a mérési pontok n=10 mérés/csoport átlagait ± S.E.M. mutatják)

Az oSMF hatása a carrageeninnel kiváltott akut nocifenzív viselkedésre RTX-előkezelt állatokban

A kontroll csoportban a mechanonociceptív küszöb 8.7 ± 0.2 grammról 5.5 ± 0.2 grammra csökkent a carrageenin-adást követő harmadik órában, ami 36%-os hiperalgéziát jelent. Azokban az egerekben, amiket a mérés előtt oSMF-ketrecbe helyeztünk, a kezdeti 8.9 ± 0.3 grammos küszöbérték csak 7.4 ± 0.7 grammra csökkent, ami csupán 14%-os küszöbcsökkenést jelent. Ez a különbség a két csoport között szignifikáns (33.ábra).

Az RTX-előkezelte állatcsoportban a carrageenin hatására a kezdeti értékről, 9.0 ± 0.1 grammról 6.64 ± 0.5 grammra (26%-kal) csökkent a fájdalomküszöb a kontroll csoportban. Az oSMF-ben tartott állatokban a kezdeti 9.3 ± 0.2 grammról 7.9 ± 0.5 grammra változott a fájdalomküszöb, ami 15%-os hiperalgéziát jelent. A kontroll mechanonociceptív küszöb csökkent ugyan RTX-deszenzibilizációt követően, az eltérés azonban nem szignifikáns (33.ábra).



33.ábra: Az oSMF hatása a carrageeninnel kiváltott akut nocifenzív viselkedésre RTX-előkezelte állatokban

(az oszlopok $n=6-8$ mérés/csoport átlagait \pm S.E.M. mutatják, ahol $*p<0.05$ az optimalizált mágneses térbe nem helyezett csoporthoz viszonyítva)

Az oSMF hatása az egerek koordinációjára és motoros működésére

Az állatok egy részét 30 percig az oSMF hatásának tettük ki, míg egy másik csoportot kontroll ketrecben tartottunk. A kezelés előtt és után is elvégeztük a rotarod tesztet mindkét állatcsoporton. A kontroll állatok átlagosan 46.5 ± 8.1 másodpercet töltöttek a készülék dobján a ketrecbe helyezés előtt, és 65.9 ± 7.8 másodpercet utána. Az oSMF ketrecben tartott állatok a kezelés előtt 50.7 ± 5.5 másodpercig maradtak a dobon, kezelés után ez az átlagérték 63.6 ± 10.7 másodpercnek adódott. Sem a két csoport között, sem az egyes csoportok kezelés előtti és kezelés utáni értékei között nem tapasztaltunk szignifikáns eltéréseket. Az optimalizált sztatikus mágneses tér tehát sem az egerek motoros működését, sem a mozgáskoordinációját nem befolyásolja.

4. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

Fenti eredményeink azt mutatják, hogy az oSMF antinociceptív, antihyperalgéziás hatásokkal rendelkezik többféle egérmódelben. Az oSMF gátolta mind az ecetsavval, mind a MgSO₄-tal kiváltott akut viscerális kemonocicepciót, amely hatás kifejezettebb volt az ecetsavval kiváltott vonaglási tesztben. Ez a különbség valószínűleg e kémiai anyagok eltérő fájdalomkeltő mechanizmusában keresendő: a MgSO₄ által okozott nocifenzív reakció elsősorban kemonociceptorok direkt stimulálásával jön létre, míg az ecetsav-indukálta vonaglás akut gyulladásos folyamatok eredménye (Gyires & Torma 1984).

A formalin tesztben az I. fázisban direkt kemonociceptív hatás jelentkezik, a másodikban már akut gyulladásos reakciók következményeképpen fellépő nocifenzív viselkedést láthatunk. A kontroll csoportokban az RTX-előkezelés az I. fázisban nem, de a II. fázisban jelentősen csökkent reakciókat eredményezett, amely azt igazolja, hogy a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégződésekből aktiváció hatására felszabaduló szenzoros neuropeptidok (például a P-anyag, CGRP) szerepet játszanak a formalinnal kiváltott akut gyulladásos reakció kialakulásában. Az oSMF formalinnal kiváltott nocifenzív reakciókat gátló hatása elmaradt a kapszaicin-érzékeny rostok reziniferatoxinnal történő inaktiválása után. Az I. fázisban az oSMF antinociceptív hatásának hátterében a kapszaicin-érzékeny idegvégzésekbe történő Na⁺-beáramlás és a következményes akciós potenciál kialakulásának gátlása állhat. A II. fázisban tapasztalt gátló hatásban azonban az oSMF hatására a kapszaicin-érzékeny afferensekbe történő csökkent Ca²⁺-beáramlás és a neurogén gyulladásos reakciót kiváltó szenzoros neuropeptidok csökkent felszabadulása is szerepet játszhat. Ezt a teóriát alátámasztják azon irodalmi adatok, amelyek az SMF Ca²⁺- és Na⁺-áramokat gátló és ezeken keresztül a neuronális excitabilitást csökkentő hatásaira vonatkoznak (Rosen 1996; Wieraszko 2000; Rosen 2003). Csökkent vizuális kiváltott potenciálokat és alacsonyabb spontán kisüléseket találtak macska nucleus geniculatus lateralisban mágneses expozíció hatására, amelyet a membrán mágnesezhető foszfolipid molekuláinak lassú visszarendeződésével és a következményes ioncsatorna-működés gátlásával magyaráztak (Rosen 2003).

A carrageenin, ami farmakológiai modellekben rendkívül gyakran használt gyulladáskeltő ágens, intraplantáris adást követően lábduzzadást és mechanikai hyperalgéziát okoz (Bölcskei et al. 2005). Ebben a folyamatban számos neurogén és nem-neurogén komponens vesz részt, amelyet gyulladásos neuropeptidok, citokinek és ciklooxygenáz termékek közvetítenek (Poole et al. 1995; Doi et al. 2002). A neurogén komponensek e patomechanizmusban betöltött nem kitüntetett szerepére utal, hogy bár a

carrageeninrel kiváltott mechanikai hiperalgészia kisebb volt az RTX-előkezelést kapott állatcsoportban, a különbség nem volt szignifikáns mértékű. Az oSMF ebben a modellben is jelentős mértékben gátolta a gyulladás következtében kialakuló mechanikai hiperalgésziát a kontroll csoportban, azonban szinte hatástalan volt az RTX-előkezelt állatokban.

Az oSMF csökkentette továbbá a TRPV1 receptor agonista RTX intraplantáris adása következtében kialakuló gyulladásos mechanikai hiperalgésziát. Az RTX proinflammációs neuropeptideket szabadít fel az érintett területen, amelyek lokális neurogén gyulladást és a mechanonociceptív küszöb csökkenését idézik elő az állat talpában. Az SMF jelentősen csökkenti a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégződésekre történő kation-áramlást, amely gátolja a szenzoros proinflammatorikus és pronociceptív neuropeptid felszabadulását. Mindemellett azonban az oSMF centrális szenzitizációt gátló hatása és csökkent szinaptikus transzmisszió sem zárható ki.

Kihangsúlyozandó, hogy a 30 percig tartó oSMF-expozíció nem befolyásolta a mozgáskoordinációt és a motoros aktivitást.

Mindezekből megállapíthatjuk, hogy az oSMF-expozíció több egérmódelben is jelentős gátló hatást gyakorolt a nociceptív reakciókra. Bár a pontos hatásmechanizmus egyelőre nem ismert, a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégzéseknek fontos szerepük van ezen antinociceptív és antihiperalgésziás hatások közvetítésében, hiszen e rostok inaktivációja után a tapasztalt gátló hatás elmaradt. Ennek hátterében a Ca^{2+} - és Na^{+} -áramok blokkolása állhat, ami az akciós potenciál gátlását, valamint a mitokondriumok elégtelen működését eredményezi (Rosen 1996; Wieraszko 2000; Rosen 2003).

ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. A szelektív sst₄ szomatosztatin receptor agonista J-2156 segítségével bizonyítékokat szolgáltatunk e receptor fájdalomcsillapító (antiallodiniás/antihyperalgéziás) és gyulladásgátló szerepére különféle egér- és patkánymodellekben. Külön kiemelendő, hogy e vegyület mindkét fajban hatékonyan gátolta a neurogén gyulladást is, amely szerepet játszik sokféle gyulladással járó kórkép kialakulásában és súlyosbodásában, és amelyre jelenleg egyetlen hatékony kezelési mód sem áll rendelkezésre. Nagy jelentőséggel bír továbbá, hogy ez az sst₄ receptor agonista csökkentette a mechanikai allodiniát traumás neuropátiában, amelyre a klasszikus nem-szteroid és opioid szerkezetű fájdalomcsillapítók hatástalanok. Bár bizonyos neuropátiás fájdalom-állapotok kezelésében az utóbbi években egyes antiepileptikumok és antidepresszánsok jelentős előrelépést jelentettek, e kórképek terápiája még mindig nem megoldott probléma. Jelen kísérleteinkkel tehát elsőként sikerült azonosítanunk egy szenzoros idegvégződéseken és gyulladással járó sejteken egyaránt expresszálandó célmolekulát, az sst₄ receptort, amelyen szelektíven ható, stabil, elsősorban nem-peptid szerkezetű agonisták alapvetően új hatásmechanizmusú, széles spektrumú gyulladásgátló és fájdalomcsillapító gyógyszerek kifejlesztésére nyújthatnak lehetőséget.
2. Jelen eredményeink az elsők a PACAP-38 nociceptív folyamatokra kifejtett perifériás hatásaira vonatkozóan. Bár térdízületben egyrost-elvezetéses elektrofiziológiai vizsgálatok a lokálisan alkalmazott PACAP-38 VIP-hez hasonló szenzitizáló hatását bizonyították, számos, elsősorban gyulladással járó egér- és patkánymodellben perifériás antinociceptív és antihyperalgéziás hatást tapasztaltunk, amelyeket a VPAC receptorok közvetítenek. Ennek a látszólagos ellentmondásnak magyarázata lehet az a tény, hogy a PACAP receptorainak aktivációja következtében a megnövekedett intracelluláris cAMP-szint neuronokon excitációt okoz ugyan, de gyulladással járó sejteken csökkenti a gyulladáskeltő mediátorok, citokinek felszabadulását. Mindezek alapján a nocicepcióra kifejtett eredő gátló hatás nagy valószínűséggel nem az idegvégződéseken megvalósuló direkt hatás eredménye, hanem a gyulladásgátló mechanizmuson alapuló indirekt hatás. Ezen eredmények gyakorlati jelentőségének és a PACAP-ban rejlő gyógyszerfejlesztési perspektíváknak a felderítése még további vizsgálatokat igényel.

3. A dolgozat harmadik részében a farmakológiai megközelítéseken túl egy alternatív fájdalomcsillapító lehetőség, a sztatikus mágneses tér állatkísérletes vizsgálatának eredményeit foglaltam össze. A készülék paramétereinek előzetes optimalizálása után az ezzel előállított oSMF antinociceptív és antihiperalgetikus hatásának bizonyult különféle egér nocicepció modellben. A tapasztalt gátló hatás mechanizmusában egyértelműen igazoltuk a kapszaicin-érzékeny érzőrostok szerepét. Bár a pontos molekuláris folyamatok felderítése még további vizsgálatokat igényel, valószínűsíthető ezen afferenseken lévő feszültségfüggő ioncsatornák (Na^+ , Ca^{2+}), esetleg a TRPV1 receptor/kationcsatorna működésének oSMF-kiváltotta gátlása. E mechanizmusokon keresztül az oSMF feltehetően akadályozza az akciós potenciál kialakulását és terjedését, valamint csökkenti a pronociceptív neuropeptidek felszabadulását. A mágneses tér ilyen irányú felhasználása érdekes új irányokat mutathat a fájdalomcsillapító terápiában.

IRODALOMJEGYZÉK

Abad C, Gomariz RP, Waschek JA (2006). Neuropeptide mimetics and antagonists in the treatment of inflammatory disease: focus on VIP and PACAP. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 6: 151-163.

Abad C, Martinez C, Leceta J, Gomariz RP, Delgado M (2001). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibits collagen-induced arthritis: an experimental immunomodulatory therapy. *Journal of Immunology* 167: 3182-3189.

Amara SG, Jonas V, Rosenfeld MG, Ong ES, Evans RM (1982). Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* 298: 240-244.

Arimura A, Somogyvári-Vigh A, Miyata A, Mizuno K, Coy DH, Kitada C (1991). Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: Highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology* 129: 2787-2789.

Barnes PJ (2001). Molecular mechanisms of corticosteroids in allergic diseases. *Allergy* 56: 928-936.

Bennett GJ (1993). An animal model of neuropathic pain: a review. *Muscle & Nerve* 16: 1040-1048.

Bevan S, Szolcsányi J (1990). Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. *Trends in Pharmacological Sciences* 11: 330-333.

Billiau A, Matthys P (2001). Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *Journal of Leukocyte Biology* 70: 849-860.

Blumberg PM (1988). Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters: sixth Rhodes memorial award lecture. *Cancer Research* 48: 1-8.

Bölcskei K, Horváth D, Szolcsányi J, Pethő G (2007). Heat injury-induced drop of the noxious heat threshold measured with an increasing-temperature water bath: a novel rat thermal hyperalgesia model. *European Journal of Pharmacology* 564: 80-87.

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

Brazeau P (1986). Somatostatin: a peptide with unexpected physiologic activities. *American Journal of Medicine* 81: 8-13.

Cao T, Pintér E, Al-Rashed S, Gerard NP, Hoult R, Brain S (2000). Neurokinin-1 receptor agonists are involved in mediating neutrophil accumulation in the inflamed, but not normal, cutaneous microvasculature: an in vivo study using neurokinin-1 receptor knockout mice. *Journal of Immunology* 164: 5424-5429.

Cao T, Gerard NP, Brain SD (1999). Use of NK1 knockout mice to analyze substance P-induced edema formation. *American Journal of Physiology* 277: 476-481.

Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288: 306-313.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816-824.

Choleris E, Del Seppia C, Thomas AW, Luschi P, Ghione S, Moran GR, Prato FS (2002). Shielding, but not zeroing of the ambient magnetic field reduces stress-induced analgesia in mice. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 269: 193-201.

Chrubasik J (1991). Somatostatin and chronic pain management. In: *Contemporary issues in chronic pain management* 87-96. Editor: Parris WCV. Boston.

- Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, Julius D (2001). Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature* 411: 957-962.
- Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405: 183-187.
- Delgado M, Leceta J, Ganea D (2003). Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit the production of inflammatory mediators by activated microglia. *Journal of Leukocyte Biology* 73: 155-164.
- Delgado M, Munoz-Elias EJ, Gomariz RP, Ganea D (1999a). Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide enhance IL-10 production by murine macrophages: in vitro and in vivo studies. *Journal of Immunology* 162: 1707-1716.
- Delgado M, Munoz-Elias EJ, Gomariz RP, Ganea D (1999b). Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevent inducible nitric oxide synthase transcription in macrophages by inhibiting NF-kappa B and IFN regulatory factor 1 activation. *Journal of Immunology* 162: 4685-4696.
- Dellemiijn P (1999). Are opioids effective in relieving neuropathic pain? *Pain* 80: 453-462.
- Del Seppia C, Mezzasalma L, Choleris E, Luschi P, Ghione S (2003). Effects of magnetic field exposure on open field behaviour and nociception responses in mice. *Behavioural Brain Research* 144: 1-9.
- de Swert KO, Joos GF (2006). Extending the understanding of sensory neuropeptides. *European Journal of Pharmacology* 533: 171-181.
- Dickinson T, Fleetwood-Walker SM (1999). VIP and PACAP: very important in pain? *Trends in Pharmacological Sciences* 20: 324-329.
- Dickinson T, Mitchell R, Robberecht P, Fleetwood-Walker SM (1999). The role of VIP/PACAP receptor subtypes in spinal somatosensory processing in rats with an experimental peripheral mononeuropathy. *Neuropharmacology* 38: 167-180.
- Doi Y, Minami T, Nishizawa M, Mabuchi T, Mori H, Ito S (2002). Central nociceptive role of prostacyclin (IP) receptor induced by peripheral inflammation. *Neuroreport* 13: 93-96.
- Dun EC, Huang RL, Dun SL, Dun NJ (1996). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-immunoreactivity in human spinal cord and dorsal root ganglia. *Brain Research* 721: 233-237.
- Eckhardt ET, Cheplovitz F, Lipo N, Govier WM (1958). Etiology of chemically induced writhing in mouse and rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 98: 186-188.
- Edvinsson L, Fredholm BB, Hamel E, Jansen I, Verrecchia C (1985). Perivascular peptides relax cerebral arteries concomitant with stimulation of cyclic adenosine monophosphate accumulation or release of an endothelium-derived relaxing factor in the cat. *Neuroscience Letters* 58: 213-217.
- Ekblad E (1999). Pharmacological evidence for both neuronal and smooth muscular PAC1 receptors and a VIP-specific receptor in rat colon. *Regulatory Peptides* 85: 87-92.
- Engström M, Savola JM, Würster S (2006). Differential efficacies of somatostatin receptor agonists for G-protein activation and desensitization of somatostatin receptor subtype 4-mediated responses. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 316: 1262-1268.
- Engström M, Tomperi J, El Darwish K, Ahman M, Savola JM, Würster S (2005). Superagonism at the human somatostatin receptor subtype 4. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 312: 332-338.
- Fahrenkrug J, Hannibal J (1998). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide immunoreactivity in capsaicin-sensitive nerve fibres supplying the rat urinary tract. *Neuroscience* 83: 1261-1272.

Fioravanti A, Govoni M, La Montagna G, Perpignano G, Tirri G, Trotta F, Bogliolo A, Ciocci A, Mauceri MT, Marcolongo R (1995). Somatostatin 14 and joint inflammation: evidence for intraarticular efficacy of prolonged administration in rheumatoid arthritis. *Drugs under Experimental and Clinical Research* 21: 97-103.

Frossard N, Advenier C (1991). Tachykinin receptors and the airways. *Life Sciences* 49: 1941-1953.

Ganea D, Delgado M (2002). Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as modulators of both innate and adaptive immunity. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 13: 229-237.

Gottschall PE, Tatsuno I, Miyata A, Arimura A (1990). Characterization and distribution of binding sites for the hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Endocrinology* 127: 272-277.

Grant A (2002). Leukocytes and neurogenic inflammation. *Inflammopharmacology* 9: 403-420.

Gunthorpe MJ, Benham CD, Randall A, Davis JB (2002). The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends in Pharmacological Sciences* 23: 183-191.

Gyires K, Torma Z (1984). The use of writhing test in mice for screening different types of analgesics. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie* 267: 131-140.

Hamelink C, Tjurmina O, Damadzic R, Young WS, Weihe E, Lee HW, Eiden LE (2002). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a sympathoadrenal neurotransmitter involved in catecholamine regulation and glucohomeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 461-466.

Han SP, Naes L, Westfall TC (1990). Calcitonin gene-related peptide is the endogenous mediator of nonadrenergic-noncholinergic vasodilation in rat mesentery. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 255: 423-428.

Hannibal J, Ekblad E, Mulder H, Sundler F, Fahrenkrug J (1998). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the gastrointestinal tract of the rat: distribution and effects of capsaicin or denervation. *Cell and Tissue Research* 291: 65-79.

Harmar AJ, Arimura A, Gozes I, Journot L, Laburthe M, Pisegna JR, Rawlings SR, Robberecht P, Said SI, Sreedharan SP, Wank SA, Waschek JA (1998). International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacological Reviews* 50: 265-270.

Hayes P, Meadows HJ, Gunthorpe MH, Harries MH, Duckworth DM, Cairns W, Harrison DC, Clarke CE, Ellington K, Prinjha RK, Barton AJ, Medhurst AD, Smith GD, Topp S, Murdock P, Sanger GJ, Terrett J, Jenkins O, Benham CD, Randall AD, Gloger IS, Davis JB (2000). Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain* 88: 205-215.

Helyes Zs, Pozsgai G, Börzsei R, Németh J, Bagoly T, Márk L, Pintér E, Tóth G, Elekes K, Szolcsányi J, Reglödi D (2007). Inhibitory effect of PACAP-38 on acute neurogenic and non-neurogenic inflammatory processes in the rat. *Peptides* 28: 1847-1855.

Helyes Zs, Pintér E, Németh J, Sándor K, Elekes K, Szabó Á, Pozsgai G, Keszthelyi D, Kereskai L, Engström M, Würster S, Szolcsányi J (2006). Effects of the somatostatin receptor subtype 4 selective agonist J-2156 on sensory neuropeptide release and inflammatory reactions in rodents. *British Journal of Pharmacology* 149: 405-415.

Helyes Zs, Pintér E, Szolcsányi J (2005). TT-232. *Drugs of the Future* 30: 1-9.

Helyes Zs, Szabó Á, Németh J, Jakab B, Pintér E, Bánvölgyi Á, Kereskai L, Kéri Gy, Szolcsányi J (2004). Anti-inflammatory and analgesic effect of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model of the rat. *Arthritis & Rheumatism* 50: 1677-1685.

Helyes Zs, Pintér E, Németh J, Szolcsányi J (2003). Pharmacological targets for the inhibition of neurogenic inflammation. *Current Medicinal Chemistry* 2: 191-218.

Helyes Zs, Pintér E, Németh J, Kéri Gy, Than M, Oroszi G, Horváth A, Szolcsányi J (2001). Anti-inflammatory effect of synthetic somatostatin analogues in the rat. *British Journal of Pharmacology* 134: 1572-1579.

- Helyes Zs, Than M, Oroszi G, Pintér E, Németh J, Kéri Gy, Szolcsányi J (2000). Anti-nociceptive effect induced by somatostatin released from sensory nerve terminals and by synthetic somatostatin analogues in the rat. *Neuroscience Letters* 278: 185-188.
- Hernandez M, Barahona MV, Recio P, Rivera L, Benedito S, Martinez AC, Garcia-Sacristan A, Orensanz LM, Prieto D (2004). Heterogeneity of neuronal and smooth muscle receptors involved in the VIP- and PACAP-induced relaxations of the pig intravesical ureter. *British Journal of Pharmacology* 141: 123-131.
- Hofland LJ, Lamberts SW (1996). Somatostatin receptors and disease: role of receptor subtypes. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism* 10: 163-176.
- Holzer P (1991). Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacological Reviews* 43: 143-201.
- Hong CZ, Shellock FG (1990). Short-term exposure to a 1.5 tesla static magnetic field does not affect somato-sensory-evoked potentials in man. *Magnetic Resonance Imaging* 8: 65-69.
- Houpt TA, Pittmann DW, Barranco JM, Brooks Eh, Smith JC (2003). Behavioural effects of high-strength static magnetic fields on rats. *Journal of Neurosciences* 23: 1489-1505.
- Hoyer D, Bell GI, Berelowitz M, Epelbaum J, Feniuk W, Humphrey PP, O'Carroll AM, Patel YC, Schonbrunn A, Taylor JE (1995). Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 16: 86-88.
- Högyes A (1878). Beiträge zur physiologischen Wirkung der Bestandteile de capsicum anuum. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 9: 117-130.
- Hughes SR, Brain SD (1994). Nitric oxide-dependent release of vasodilator quantities of calcitonin gene-related peptide from capsaicin-sensitive nerves in rabbit skin. *British Journal of Pharmacology* 111: 425-430.
- Jancsó N, Jancsó-Gábor A, Szolcsányi J (1967). Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *British Journal of Pharmacology* 31: 138-151.
- Jancsó N (1960). Role of nerve terminals in the mechanism of inflammatory reactions. *Bulletin of Millard Fillmore Hospital Buffalo* 7: 53-77.
- Jessell TM, Iversen LL, Cuello AC (1978). Capsaicin-induced depletion of substance P from primary sensory neurones. *Brain Research* 152: 183-188.
- Joe B, Wilder RL (1999). Animal models of rheumatoid arthritis. *Molecular Medicine Today* 5: 367-369.
- Jones BJ, Roberts DJ (1968). A rotarod suitable for quantitative measurements of motor incoordination in naïve mice. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 259: 211.
- Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Hogestatt ED, Meng ID, Julius D (2004). Mustard oil and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427: 260-265.
- Karalis K, Mastorakos G, Chrousos GP, Tolis G (1994). Somatostatin analogues suppress the inflammatory reaction in vivo. *Journal of Clinical Investigation* 93: 2000-2006.
- Kavaliers M, Ossenkopp KP (1994). Effects of magnetic fields and electric fields in invertebrates and lower vertebrates. In: *Biological effects of electric and magnetic fields. Sources and mechanisms* 205-240. Editors: Carpenter DO, Ayrapetyan S. Academic Press, New York.
- Kavaliers M, Ossenkopp KP, Hirst M (1984). Magnetic field abolish the enhanced nocturnal analgesic response to morphine in mice. *Physiology & Behavior* 32: 261-264.
- Kim SH, Chung JM (1992). An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50: 355-363.

- Koch BD, Blalock JB, Schönbrunn A (1988). Characterization of the cyclic AMP-independent actions of somatostatin in GH cells. I. An increase in potassium conductance is responsible for both the hyperpolarization and the decrease in intracellular free calcium produced by somatostatin. *Journal of Biological Chemistry* 263: 216-225.
- Kojima M, Ito T, Oono T, Hisano T, Igarashi H, Arita Y, Kawabe K, Coy DH, Jensen RT, Nawata H (2005). VIP attenuation of the severity of experimental pancreatitis is due to VPAC1 receptor-mediated inhibition of cytokine production. *Pancreas* 30: 62-70.
- Koster R, Anderson M, de Beer EJ (1959). Acetic acid for analgesic screening. *Federation Proceedings* 18: 412.
- Kuehl FA Jr, Zanetti ME, Soderman DD, Miller DK, Ham EA (1987). Cyclic AMP-dependent regulation of lipid mediators in white cells. A unifying concept for explaining the efficacy of theophylline in asthma. *American Review of Respiratory Disease* 36: 210-213.
- Laburthe M, Couvineau A, Tan V (2007). Class II G-protein-coupled receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology. *Peptides* 28: 1631-1639.
- Lam HC, Takahashi K, Ghatei MA, Kanze SM, Polak JM, Bloom SR (1990). Binding sites of a novel neuropeptide pituitary-adenylate-cyclase-activating polypeptide in the rat brain and lung. *European Journal of Biochemistry* 193: 725-729.
- László J, Reiczigel J, Székely L, Gasparics A, Bogár I, Bors L, Rácz B, Gyires K (2007). Optimization of static magnetic field parameters improves analgesic effect in mice. *Bioelectromagnetics* 28: 615-627.
- Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW (2001). Animal models of nociception. *Pharmacological Reviews* 53: 597-652.
- Leceta J, Gomariz RP, Martinez C, Abad C, Ganea D, Delgado M (2000). Receptors and transcriptional factors involved in the anti-inflammatory activity of VIP and PACAP. *Annals of the New York Academy of Sciences* 921: 92-102.
- Lembeck F, Donnerer J, Barthó L (1982). Inhibition of neurogenic vasodilation and plasma extravasation by substance P antagonists, somatostatin and [D-Met², Pro⁵]enkephalinamide. *European Journal of Pharmacology* 85: 171-176.
- Lembeck F, Holzer P (1979). Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 310: 175-183.
- Lockwood DR, Kwon B, Smith JC, Haupt TA (2003). Behavioural effects of static high magnetic fields on unrestrained and restrained mice. *Physiology & Behavior* 78: 635-640.
- Mabuchi T, Shintani N, Matsumura S, Okuda-Ashitaka E, Hashimoto H, Muratani T, Minami T, Baba A, Ito S (2004). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is required for the development of spinal sensitization and induction of neuropathic pain. *Journal of Neurosciences* 24: 7283-7291.
- Macpherson LJ, Xiao B, Kwan KY, Petrus MJ, Dubin AE, Hwang S, Cravatt B, Corey DP, Patapoutian A (2007). An ion channel essential for sensing chemical damage. *Journal of Neuroscience* 27: 11412-11415.
- Maggi CA (1995). Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Progress in Neurobiology* 45: 1-98.
- Maggi CA, Meli A (1988). The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *General Pharmacology: The Vascular System* 19: 1-43.
- Makhlouf GM, Murthy KS (1997). Signal transduction in gastrointestinal smooth muscle. *Cell Signal* 9: 269-276.
- Martinez C, Abad C, Delgado M, Arranz A, Juarranz MG, Rodriguez-Henche N, Brabet P, Leceta J, Gomariz RP (2002). Anti-inflammatory role in septic shock of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 1053-1058.
- Massi M, Panocka I, de Garo G (2000). The psychopharmacology of tachykinin NK-3 receptors in laboratory animals. *Peptides* 21: 1597-1609.
- May V, Beaudet MM, Parsons RL, Braas KM (2000). PACAP modulates rat sympathetic neuron depolarization through IP3. *Annals of the New York Academy of Sciences* 921: 186-194.

McDougall JJ, Watkins L, Li Z (2006). Vasoactive intestinal peptide (VIP) is a modulator of joint pain in a rat model of osteoarthritis. *Pain* 123: 98-105.

McDougall JJ, Barin AK (2005). The role of joint nerves and mast cells in the alteration of vasoactive intestinal peptide (VIP) sensitivity during inflammation progression in rats. *British Journal of Pharmacology* 145: 104-113.

McIntyre P, McLatchie LM, Chambers A, Phillips E, Clarke M, Savidge J, Toms C, Peacock M, Shah K, Winter J, Weerasakera N, Webb M, Rang HP, Bevan S, James IF (2001). Pharmacological differences between the human and rat vanilloid receptor 1 (VR1). *British Journal of Pharmacology* 132: 1084-1094.

McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM (1998). RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393: 333-339.

Mikkelsen JD, Hannibal J, Fahrenkrug J, Larsen PJ, Olcese J, McArdle C (1995). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide-38 (PACAP-38), PACAP-27, and PACAP related peptide (PRP) in the rat median eminence and pituitary. *Journal of Neuroendocrinology* 7: 47-55.

Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH (1989). Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 164: 567-574.

Moller K, Zhang YZ, Hakanson R, Luts A, Sjölund B, Uddman R, Sundler F (1993). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide is a sensory neuropeptide: Immunocytochemical and immunochemical evidence. *Neuroscience* 57: 725-732.

Mulder H, Uddman R, Moller K, Zhang YZ, Ekblad E, Alumets J, Sundler F (1994). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide expression in sensory neurons. *Neuroscience* 63: 307-312.

Muller JM, Debaigt C, Coursaud S, Montoni A, Pineau N, Meunier AC, Janet T (2007). Unconventional binding sites and receptors for VIP and related peptides PACAP and PHI/PHM: an update. *Peptides* 28: 1655-1666.

Narita M, Dun SL, Dun NJ, Tseng LF (1996). Hyperalgesia induced by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the mouse spinal cord. *European Journal of Pharmacology* 311: 121-126.

Németh J, Reglődi D, Pozsgai G, Szabó Á, Elekes K, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Zs (2006). Effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 on sensory neuropeptide release and neurogenic inflammation in rats and mice. *Neuroscience* 143: 223-230.

Njuki F, Nicholl CG, Howard A, Mak JC, Barnes PJ, Girgis SI, Legon S (1993). A new calcitonin-receptor-like sequence in rat pulmonary blood vessels. *Clinical Science (London, England 1979)* 85: 385-388.

Nolte CM, Pittmann DW, Kalevitch B, Henderson R, Smith JC (1998). Magnetic field conditioned taste aversion in rats. *Physiology & Behavior* 63: 683-688.

Odum L, Petersen LJ, Skov PS, Ebskov LB (1998). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) is localized in human dermal neurons and causes histamine release from skin mast cells. *Inflammation Research* 47: 488-492.

Oh U, Hwang SW, Kim D (1996). Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. *Journal of Neurosciences* 16: 1659-1667.

Ohsawa M, Brailoiu GC, Shiraki M, Dun NJ, Paul K, Tseng LF (2002). Modulation of nociceptive transmission by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the spinal cord of the mouse. *Pain* 100: 27-34.

Onou T, Shimizu T, Sakamoto H, Higashi M, Kanmura Y, Miyata A (2007). Involvement of opioidergic system in supraspinal PACAP analgesia and the tolerance. *Journal of Molecular Neuroscience* 33: 339.

Parsons RL, Rossignol TM, Calupca MA, Hardwick JC, Brass KM (2000). PACAP peptides modulate guinea pig cardiac neuron membrane excitability and neuropeptide expression. *Annals of the New York Academy of Sciences* 921: 202-210.

Parsons JA, Erlandsen SL, Hegre OD, McEvoy RC, Elde RP (1976). Central and peripheral localization of somatostatin. Immunozyme immunocytochemical studies. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 24: 872-882.

- Patacchini R, Maggi CA (2001). Peripheral tachykinin receptors as targets for new drugs. *European Journal of Pharmacology* 429: 13-21.
- Patel YC, Greenwood MT, Panetta R, Demchyshyn L, Niznik H, Srikant CB (1995). The somatostatin receptor family. *Life Sciences* 57: 1249-1265.
- Pintér E, Helyes Zs, Szolcsányi J (2006). Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception. *Pharmacology & Therapeutics* 112: 440-456.
- Pintér E, Helyes Zs, Németh J, Pórszász R, Pethő G, Than M, Kéri Gy, Horváth A, Jakab B, Szolcsányi J (2002). Pharmacological characterisation of the somatostatin analogue TT-232: effects on neurogenic and non-neurogenic inflammation and neuropathic hyperalgesia. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 366: 142-150.
- Piomelli D, Giuffrida A, Calignano A, Rodriguez DF (2000). The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends in Pharmacological Sciences* 21: 218-224.
- Poole S, Cunha FQ, Selkirk S, Lorenzetti BB, Ferreira SH (1995). Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10. *British Journal of Pharmacology* 115: 684-688.
- Poyner DR, Sexton PM, Marshall I, Smith DM, Quirion R, Born W, Muff R, Fischer JA, Foord SM (2002). International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacological Reviews* 54: 233-246.
- Prato FS, Robertson JA, Desjardins D, Hensel J, Thomas AW (2005). Daily repeated magnetic field shielding induces analgesia in CD-1 mice. *Bioelectromagnetics* 26: 109-117.
- Raynor K, Reisine T (1992). Somatostatin receptors. *Critical Reviews in Neurobiology* 6: 273-289.
- Reeser JC, Smith DT, Fischer V, Berg R, Liu K, Untiedt C, Kubista M (2005). Static magnetic fields neither prevent nor diminish symptoms and signs of delayed onset muscle soreness. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 86: 565-570.
- Regoli D, Boudon A, Fauchere JL (1994). Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacological Reviews* 46: 551-599.
- Reichlin S (1983). Somatostatin. *New England Journal of Medicine* 309: 1495-1501.
- Reubi JC, Laissue JA, Waser B, Steffen DL, Hipkin W, Schonbrunn A (1999). Immunohistochemical detection of somatostatin sst_{2a} receptors in the lymphatic, smooth muscular, and peripheral nervous systems of the human gastrointestinal tract: facts and artifacts. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 84: 2942-2950.
- Riedel W, Neeck G (2001). Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *Zeitschrift für Rheumatologie* 60: 404-415.
- Rosen AD (2003). Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems. *Cell Biochemistry and Biophysics* 39: 163-173.
- Rosen AD (1996). Inhibition of calcium channel activation in GH3 cells by static magnetic fields. *Biochimica et Biophysica Acta* 1148: 149-155.
- Said SI (2000). VIP and PACAP in pain and inflammation. *Trends in Pharmacological Sciences* 21: 57.
- Saunders R (2005). Static magnetic fields: animal studies. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 87: 225-239.
- Schuelert N, McDougall JJ (2006). Electrophysiological evidence that the vasoactive intestinal peptide receptor antagonist VIP6-28 reduces nociception in an animal model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 14: 1155-1162.
- Schwab W, Bilgicyldirim A, Funk RH (1997). Microtopography of the automatic nerves in the rat knee: a fluorescence microscopic study. *Anatomical Record* 247: 109-118.

- Seebeck J, Lowe M, Kruse ML, Schmidt WE, Mehdorn HM, Ziegler A, Hempelmann RG (2002). The vasorelaxant effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide in isolated rat basilar arteries is partially mediated by activation of nitroergic neurons. *Regulatory Peptides* 107: 115-123.
- Segre GV, Goldring SR (1993). Receptors for secretin, calcitonin, parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide, glucagon-like peptide 1, growth hormone releasing hormone, and glucagon belong to a newly discovered G-protein-linked receptor family. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 4: 309-314.
- Seltzer Z, Dubner R, Shir Y (1990). A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43: 205-218.
- Sherwood NM, Krueckl SL, McRory JE (2000). The origin and function of the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP)/glukagon superfamily. *Endocrine Reviews* 21: 619-670.
- Shimizu T, Katahira M, Sugawara H, Inoue K, Miyata A (2004). Diverse effects of intrathecal pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on nociceptive transmission in mice spinal cord. *Regulatory Peptides* 123: 117-122.
- Shin J, Cho H, Hwang SW, Jung JY, Shin CY, Lee SY, Kim SH, Lee MG, Choi YH, Kim J, Haber NA, Reichling DB, Khasar S, Levine JD, Oh U (2002). Bradykinin-12-lipoxygenase-VR1 signaling pathway for inflammatory hyperalgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 10150-10155.
- Shioda S, Nakai Y, Nakajo S, Nakaya K, Arimura A (1996). Localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its type I receptors in the rat ovary: Immunohistochemistry and in situ hybridization. *Annals of the New York Academy of Sciences* 805: 677-683.
- Shioda S, Legradi G, Leung WC, Nakajo S, Nakaya K, Arimura A (1994). Localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its messenger ribonucleic acid in the rat testis by light and electron microscopic immunocytochemistry and *in situ* hybridization. *Endocrinology* 135: 818-825.
- Shupak NM, Hensel JM, Cross-Mellor SK, Kavaliers M, Prato FS, Thomas AW (2004). Analgesic and behavioral effects of a 100 microT specific pulsed extremely low frequency magnetic field on control and morphine-treated CF-1 mice. *Neuroscience Letters* 354: 30-33.
- Skofitsch G, Donnerer J, Petronijevic S, Saria A, Lembeck F (1983). Release of histamine by neuropeptides from the perfused rat hindquarter. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 322: 153-157.
- Snyder DJ, Jahng JW, Smith JC, Houpt TA (2000). C-Fos induction in visceral and vestibular nuclei of the rat brain stem by a 9.4T magnetic field. *Neuroreport* 11: 2681-2685.
- Somogyvári-Vigh A, Reglödi D (2004). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: a potential neuroprotective peptide. *Current Pharmaceutical Design* 10: 2861-2889.
- Spengler D, Waeber C, Pantaloni C, Holsboer F, Bockaert J, Seeburg PH, Journot L (1993). Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* 365: 170-175.
- Suda K, Smith DM, Ghatei MA, Bloom SR (1992). Investigation of the interaction of VIP binding sites with VIP and PACAP in human brain. *Neuroscience Letters* 137: 19-23.
- Szállási Á, Cruz F, Gepetti P (2006). TRPV1: a therapeutic target for novel analgesic drugs. *Trends in Molecular Medicine* 12: 545-554.
- Szállási Á, Blumberg PM (1999). Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacological Reviews* 51: 159-212.
- Szállási Á, Joó F, Blumberg PM (1989). Duration of desensitization and ultrastructural changes in dorsal root ganglia in rats treated with resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog. *Brain Research* 503: 68-72.
- Szolcsányi J (2004). Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptides* 38: 377-384.

- Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Zs (2004). Sensocrine function of capsaicin-sensitive nociceptors mediated by somatostatin regulates against inflammation and hyperalgesia. In: *Hyperalgesia: molecular mechanisms and clinical implications* 113-128. Editors: Handwerker HO, Brune K. IASP Press, Seattle.
- Szolcsányi J, Helyes Zs, Oroszi G, Németh J, Pintér E (1998a). Release of somatostatin and its role in the mediation of the anti-inflammatory effect induced by antidromic stimulation of sensory fibres of rat sciatic nerve. *British Journal of Pharmacology* 123: 936-942.
- Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Zs, Oroszi G, Németh J (1998b). Systemic anti-inflammatory effect induced by counter-irritation through a local release of somatostatin from nociceptors. *British Journal of Pharmacology* 125: 916-922.
- Szolcsányi J (1996). Capsaicin-sensitive sensory nerve terminals with local and systemic efferent functions: facts and scopes of an unorthodox neuroregulatory mechanism. *Progress in Brain Research* 113: 343-359.
- Szolcsányi J (1993). Actions of capsaicin on sensory receptors. In: *Capsaicin in the study of pain* 1-26. Editor: Wood JN. Academic Press, London.
- Szolcsányi J (1988). Antidromic vasodilatation and neurogenic inflammation. *Agents and Actions* 23: 4-11.
- Szolcsányi J (1984). Capsaicin-sensitive chemonociceptive neural system with dual sensory-efferent function. In: *Antidromic Vasodilatation and Neurogenic Inflammation* 27-53. Editors: Chahl LA, Szolcsányi J, Lembeck F. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Szolcsányi J, Jancsó-Gábor A (1976). Sensory effects of capsaicin congeners II: Importance of chemical structure and pungency in desensitizing activity of capsaicin-type compounds. *Arzneimittel-Forschung* 26: 33-37.
- Szolcsányi J, Jancsó-Gábor A (1975). Sensory effects of capsaicin congeners I: Relationship between chemical structure and pain-producing potency of pungent agents. *Arzneimittel-Forschung* 25: 1877-1881.
- Taiwo YO, Heller PH, Levine JD (1992). Mediation of serotonin hyperalgesia by the cAMP second messenger system. *Neuroscience* 48: 479-483.
- Taiwo YO, Levine JD (1991). Further confirmation of the role of adenylyl cyclase and of cAMP-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. *Neuroscience* 44: 131-135.
- Tajti J, Vécsei L (2006). Mozgásszervi megbetegedéseket utánzó neuropátiás fájdalmak patomechanizmusa és terápiája. *Magyar Tudomány* 167: 1191-1196.
- Takeba Y, Suzuki N, Kaneko A, Asai T, Sakane T (1999). Evidence for neural regulation of inflammatory synovial cell functions by secreting calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal peptide in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 42: 2418-2429.
- Tatsuno I, Gottschall PE, Köves K, Arimura A (1990). Demonstration of specific binding sites for pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP) in rat astrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 168: 1027-1033.
- ten Bokum AM, Hofland LJ, van Hagen PM (2000). Somatostatin and somatostatin receptors in the immune system: a review. *European Cytokine Network* 11: 161-176.
- Than M, Németh J, Szilvássy Z, Pintér E, Helyes Zs, Szolcsányi J (2000). Systemic anti-inflammatory effect of somatostatin released from capsaicin-sensitive vagal and sciatic sensory fibres of the rat and guinea-pig. *European Journal of Pharmacology* 399: 251-258.
- Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51: 5-17.
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21: 531-543.
- van Rossum D, Hanisch U, Quirion R (1997). Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and functions of CGRP, related peptides and their receptors. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 21: 649-678.

- Uddman R, Grunditz T, Kato J, Sundler F (1998). Distribution and origin of nerve fibers in the rat temporomandibular joint capsule. *Anatomy and Embryology* 197: 273-282.
- Ulich TR, Guo KZ, Irwin B, Remick DG, Davatellis GN (1990). Endotoxin-induced cytokine gene expression in vivo. II. Regulation of tumor necrosis factor and interleukin-1 alpha/beta expression and suppression. *American Journal of Pathology* 137: 1173-1185.
- Vaudry D, Pamantung TF, Basille M, Rouselle C, Fournier A, Vaudry H, Beauvillain JC, Gonzalez BJ (2002). PACAP protects cerebellar granule neurons against oxidative stress-induced apoptosis. *European Journal of Neuroscience* 15: 1451-1460.
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H (2000). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacological Reviews* 52: 269-324.
- Vécsei L, Widerlöv E (1988). Brain and CSF somatostatin concentrations in patients with psychiatric or neurological illness. An overview. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 78: 657-667.
- Vígh S, Arimura A, Gottschall PE, Kitada C, Somogyvári-Vígh A, Childs GV (1993). Cytochemical characterization of anterior pituitary target cells for the neuropeptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), using biotinylated ligands. *Peptides* 14: 59-65.
- Watson GS, Sufka KJ, Coderre TJ (1997). Optimal scoring strategies and weights for the formalin test in rats. *Pain* 70: 53-58.
- Weckbecker G, Lewis I, Albert R, Schmid HA, Hoyer D, Bruns C (2003). Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects. *Nature Reviews, Drug Discovery* 2: 999-1017.
- Weinberg A, Halpern M, Zahalka MA, Quintana F, Traub L, Moroz C (2003). Placental immunomodulator ferritin, a novel immunoregulator, suppresses experimental arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 48: 846-853.
- Weston MC, Peachell PT (1998). Regulation of human mast cell and basophil function by cAMP. *General Pharmacology* 31: 715-719.
- Wieraszko A (2000). Dantrolene modulates the activity of steady magnetic fields on hippocampal evoked potentials in vitro. *Bioelectromagnetics* 21: 175-182.
- Witkin LB, Heuter CF, Galdi F, O'Keefe E, Spitaletta P, Plummer AJ (1961). Pharmacology of 2-amino-indane hydrochloride (Su-8629), a potent non-narcotic analgesic. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 133: 400-408.
- Wray V, Kokoschke C, Nokihara K, Naruse S (1993). Solution structure of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 32: 5832-5841.
- Yamamoto T, Tatsuno I (1995). Antinociceptive effect of intrathecally administered pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on the rat formalin test. *Neuroscience Letters* 184: 32-35.
- Zhang Y, Danielsen N, Sundler F, Mulder H (1998). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide is upregulated in sensory neurons by inflammation. *Neuroreport* 9: 2833-2836.
- Zhang Y, Malmberg AB, Sjolund B, Yaksh TL (1996). The effect of pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) on the nociceptive formalin test. *Neuroscience Letters* 207: 187-190.
- Zhang Y, Sjolund B, Moller K, Hakanson R, Sundler F (1993). Pituitary adenylate cyclase activating peptide produces a marked and long-lasting depression of a C-fibre-evoked flexion reflex. *Neuroscience* 57: 733-737.
- Zheng YQ, Wei W, Dai M, Zhu L, Jia XY, Wang Y (2006). Interleukin-1 receptor antagonist intervenes in signaling between different types of synoviocytes in rats with adjuvant arthritis. *Acta Pharmacologica Sinica* 27: 111-118.
- Zhou CJ, Shioda S, Yada T, Inagaki N, Pleasure SJ, Kikuyama S (2002). PACAP and its receptors exert pleiotropic effects in the nervous system by activating multiple signaling pathways. *Current Protein & Peptide Science* 3: 423-439.
- Zimmermann M (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16: 109-110.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

Sándor K., Elekes K., Szabó Á., Pintér E., Engström M., Würster S., Szolcsányi J., Helyes Zs.: Analgesic effects of the somatostatin sst₄ receptor selective agonist J-2156 in acute and chronic pain models.

European Journal of Pharmacology 539(1-2): 71-75. 2006 (IF: 2.43)

Helyes Zs., Pintér E., Németh J., **Sándor K.**, Elekes K., Szabó Á., Pozsgai G., Keszthelyi D., Kereskai L., Engström M., Würster S., Szolcsányi J.: Effects of the somatostatin receptor subtype 4 selective agonist J-2156 on sensory neuropeptide release and inflammatory reactions in rodents.

British Journal of Pharmacology 149(4): 405-415. 2006 (IF: 3.33)

Sándor K., Helyes Zs., Gyires K., Szolcsányi J., László J.: Static magnetic field-induced anti-nociceptive effect and the involvement of capsaicin-sensitive sensory nerves in this mechanism.

Life Sciences 81(2): 97-102. 2007 (IF: 2.51)

Sándor K., Bölcskei K., McDougall J.J., Schuelert N., Reglődi D., Elekes K., Pethő G., Pintér E., Szolcsányi J., Helyes Zs.: Divergent peripheral effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 on nociception in rats and mice.

Pain, közlésre elküldve

Összesített impact faktor: 8.27

Összes független citáció: 6

EGYÉB EREDETI KÖZLEMÉNYEK

1. Szabó Á., Helyes Zs., **Sándor K.**, Bite A., Pintér E., Németh J., Bánvölgyi Á., Bölcskei K., Elekes K., Szolcsányi J.: Role of TRPV1 receptors in adjuvant-induced chronic arthritis: *in vivo* study using gene-deficient mice.

The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 314(1): 111-119. 2005 (IF: 4.31)

2. Bölcskei K., Helyes Zs., Szabó Á., **Sándor K.**, Pethő G., Elekes K., Almási R., Pintér E., Szolcsányi J.: Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice.

Pain 117(3): 368-376. 2005 (IF: 4.06)

3. Jakab B., Helyes Zs., Varga A., Bölcskei K., Szabó Á., **Sándor K.**, Elekes K., Börzsei R., Pintér E., Pethő G., Németh J., Szolcsányi J.: Examination of the novel TRPV1 receptor antagonist JYL1421 (SC0030) *in vitro* and *in vivo* in the rat.

European Journal of Pharmacology 517(1-2): 35-44. 2005 (IF: 2.43)

4. Bellis E., Hajba L., Kovács B., **Sándor K.**, Kollár L., Kokotos G.: Three generations of alpha,gamma-diaminobutyric acid modified poly(propyleneimine) dendrimers and their cisplatin-type platinum complexes.

Journal of Biochemical and Biophysical Methods 69(1-2): 151-161. 2006 (IF: 1.2)

5. Helyes Zs., Elekes K., Németh J., Pozsgai G., **Sándor K.**, Kereskai L., Börzsei R., Pintér E., Szabó Á., Szolcsányi J.: Role of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in endotoxin-induced airway inflammation in the mouse.

American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology 292(5): 1173-1181. 2007 (IF: 3.94)

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

Regulatory Peptides 141(1-3): 44-54. 2007 (IF: 2.27)

7. Pozsgai G., **Sándor K.**, Perkecz A., Szolcsányi Zs., Helyes Zs., S.D. Brain, Pintér E.: Topical acetone treatment induces neurogenic oedema on the sensitized mouse ear: an *in vivo* study using transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptor knockout mice.

Inflammation Research 56: 459-467. 2007 (IF: 1.21)

8. Elekes K., Helyes Zs., Kereskai L., **Sándor K.**, Pintér E., Pozsgai G., Tékus V., Bánvölgyi Á., Németh J., Szűts T., Kéri Gy., Szolcsányi J.: Inhibitory effects of synthetic somatostatin receptor subtype 4 agonists on acute and chronic airway inflammation and hyperreactivity in the mouse.

European Journal of Pharmacology 578(2-3): 313-322. 2008 (IF: 2.52)

Összesített impact faktor: 21.94

Összes független citáció: 28

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet mindazoknak, akik segítették a munkámat.

Elsősorban köszönöm Dr. Helyes Zsuzsannának, témavezetőmnek, hogy bevezetett a kutatómunka világába, példát mutatva szakmai ismeretből, szorgalomból, fáradhatatlan lelkesedésből és lankadatlan optimizmusból.

Köszönöm Dr. Pintér Erikának, hogy számos szakmai tanáccsal és baráti gesztussal járult hozzá kutatómunkám eredményességéhez.

Köszönöm Dr. Szolcsányi János professzornak, a Neurofarmakológia program vezetőjének, hogy a képzésben részt vehettem, és hogy rendkívül jó szakmai észrevételeivel mindig megmutatta a helyes irányt.

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

Külön köszönöm Perkecz Anikónak, aki évekig hűséges „padtársam” volt, elviselve ennek minden velejáróját, hogy baráti hozzáállásával és kiváló metszeteivel mindvégig segítette munkámat.

Köszönöm Dr. Bölcskei Katának, aki tudományos szemléletével és a kísérletes munkában való jártasságával követendő példát mutatott, hogy bármikor fordulhattam hozzá segítségért, tanácsért.

Köszönöm a kísérletes munkában nyújtott nélkülözhetetlen segítséget Góglné Katinak, Zádor Csillának, Önböliné Dórinak, Zöldhegyi Máriának, Tékus Valériának, Dr. Pozsgai Gábornak, Dr. Elekes Krisztiánnak, Tóth Dánielnek, továbbá a diákkörösöknek: Markovics Adriennek, Borbély Évának.

Köszönöm Dr. Bánvölgyi Ágnesnek a kiváló minőségű fotók elkészítését.

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

Köszönöm Dr. Kereskai Lászlónak a szövettani metszetek értékelését.

Köszönöm Dr. László Jánosnak a sztatikus mágneses térrel kapcsolatos kooperációt.

Köszönöm Dr. Reglődi Dórinak a PACAP-al kapcsolatos kísérletekben nyújtott szakmai segítséget.

Köszönöm Dr. Jason J. McDougall PACAP-os témakörben végzett kiegészítő kísérleteit.

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