

NEUROFARMAKOLÓGIA PROGRAM

PROGRAM ÉS TÉMAVEZETŐ: DR. SZOLCSÁNYI JÁNOS EGYETEMI TANÁR

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**NEUROGÉN GYULLADÁS, VALAMINT SZENZOROS NEUROPEPTID
FELSZABADULÁS VIZSGÁLATA A CAPSAICIN-ÉRZÉKENY
IDEGVÉGZŐDÉSEKBŐL FIZIOLÓGIÁS ÉS KÓROS
ÁLLAPOTOKBAN**

Dr. THÁN MÁRTA

Pécsi Tudományegyetem
Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet
2000.

ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

A CAPSAICIN-ÉRZÉKENY PRIMER AFFERENSEK KETTŐS FUNKCIÓJA

A klasszikus idegszabályozási elmélet szerint a szenzoros idegrendszer fő feladata a külső és belső környezet ingereinek felvétele a perifériás idegvégződéseken keresztül és ezek továbbítása a központi idegrendszer felé. Ugyanakkor már a múlt században Stricker (1876) és Bayliss (1901) felfedezte a gerincvelői hátsó gyökök ingerlésével a bőrben kiváltható “antidrómos vazodilatáció” jelenségét. A klasszikus elképzelés az axon reflex teórián alapulva az volt, hogy az antidrómos vazodilatációért felelős mediátorok egyes primer afferensek specializálódott effektor végződéseiből szabadulnak fel. Napjainkra már kísérletesen alátámasztott és általánosan elfogadott tény, hogy egyes szenzoros axonterminálisok kettős: afferens és efferens funkcióval is bírnak, azaz inger hatására képesek a vesiculák formájában raktározott neuropeptideket közvetlenül, axonális vezetés nélkül felszabadítani (Szolcsányi 1996). A gerincvelői érzőneuronok mai ismereteink szerint heterogén populációt képeznek, vannak tisztán afferens, kevert kettős funkciójú “szenzoros-efferens” neuronok, illetve újabban azt is feltételezik, hogy léteznek tisztán lokális effektor funkciót betöltő neuronok is az érződúcokban (Holzer 1998, Maggi 1995). Az elsődleges érzőneuronok működésének kutatásában kiemelkedő jelentősége van a *capsaicin*nek, a paprika (*Capsicum annum*) csípőanyagának (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide), melynek első farmakológiai vizsgálata magyar kutatók munkásságának az eredménye (Högyes 1878, Jancsó 1955). A capsaicin szelektíven izgatja az érzőneuronok egy meghatározott populációját, melyre a *capsaicin-érzékeny primer afferens neuron* elnevezés a nyolcvanas évek végére már általánosan elterjedt és a capsaicin farmakológiai receptorának (VR1) klónozása révén biokémiai bizonyítást nyert (Caterina és mtsai, 1997). A capsaicin és származékai ezeken az érzőneuronokon izgató, nagyobb dózisban alkalmazva deszenzitizáló, illetve neurotoxikus hatást fejtenek ki. A capsaicin által kiváltott csípő, égő fájdalomérzés tehát a capsaicin-érzékeny szenzoros idegvégződéseken található specifikus receptor aktivációján keresztül jön létre. A *capsaicin VR1 receptor* egy ligand aktivált nem-szelektív kationcsatorna, melyet a vanilloid vegyületek mellett fájdalmas hőinger, valamint savas pH (magas protonkoncentráció) is képes aktiválni, tehát ezek az ingerek tekinthetők a receptor természetes fizikai, illetve kémiai aktivátorainak. Így a capsaicin VR1 receptor egyes fájdalmas kémiai valamint fizikai ingerek integrátoraként működik a nociceptív neuronokon. Mind a mai napig nem ismert azonban a receptor endogén ligand vegyülete és nem teljesen tisztázott a szerepe fiziológias körülmények között.

A capsaicin-érzékeny nociceptív afferenseknek közös tulajdonságuk, hogy klasszikus afferens funkciójukon kívül képesek megfelelő inger hatására perifériás idegvégződéseikből tachykininek (substance P (SP), neurokinin-A (NKA)), calcitonin gén-rokon peptid (CGRP), és szomatosztatin felszabadítására. Az aktiváció hatására felszabaduló gyulladáskeltő neuropeptidok (SP, CGRP) lokális választ, úgynevezett *neurogén gyulladást* váltanak ki az ideg által innervált bőr és nyálkahártyaterületeken, ami helyi arteriolás és vénás vazodilatációval, érpermeabilitás fokozódással, plazma protein kiáramlással, majd nyálkahártyák esetén a gyulladással sejtes elemek aktivációjával jár (Gepetti és Holzer, 1996). Így a capsaicin-érzékeny érzőidegvégződések egyaránt ellátnak nociceptív afferens és lokális efferens funkciót. Előzetes vizsgálatok intézetünkben fényt derítettek arra az érdekes jelenségre, hogy exteroceptív területek capsaicin-érzékeny rostjainak antidrómos elektromos, vagy orthodrómos kémiai ingerlésével kiváltott primer neurogén gyulladás szisztémás gyulladásgátló hatása révén gátolja a test távoli részén kiváltott szekunder akár neurogén, akár nem neurogén gyulladás kifejlődését az idegvégződésekből felszabaduló szomatosztatin által.

A capsaicin-érzékeny idegvégződések jellemző tulajdonsága a nociceptív kémiai ingerekre való érzékenység. Perifériás végződéseinek tartós, endogén ingerlése, pl. krónikus gyulladások esetén, a hátsó gyöki érző ganglionok afferens, valamint efferens funkciójának megváltozását hozhatja létre. A capsaicin-érzékeny elsődleges érzőrostok fokozott aktivációja, illetve a következményes perifériás neuropeptid felszabadulás eredményeként kialakuló neurogén gyulladással számos betegség pathomechanizmusában játszik fontos szerepet (allergiás rhinitis, asthma bronchiale, chronicus bronchitis, rheumatoid arthritis, psoriasis, migraine). Ugyanakkor a szisztémás anyagcserebetegségek közül a *diabetes mellitus* súlyos szövődménye a perifériás idegek először reverzibilis funkcionális, később irreverzibilis morfológiai károsodása, amelynek jelei elsőként a legsérülékenyebb myelinhüvely nélküli, valamint vékony myelinhüvelyes szenzoros rostokon jelentkeznek. Kezeletlen kísérletes diabetesben kimutatták a n. ischiadicus, valamint a hátsó gyöki ganglionsejtek SP és CGRP tartalmának csökkenését, valamint a neuropeptidok axontranszportjának károsodását az NGF hiány, illetve a polyol anyagcsere-termékek felhalmozódása miatt. A neuropeptidok szintézisének, illetve transzportjának károsodása a szenzoros zavarokon túl a perifériás effektor funkciók romlásához is vezet, azonban a neuropeptid felszabadulás csökkenését mindeztáig nem bizonyították.

Napjainkban már több olyan szintetikus, illetve a természetben is előforduló analógot is ismerünk, melyek a capsaicin receptoron hatnak, de különböznek izgató, illetve deszenzitizáló hatásukban. Ezek közül a *resiniferatoxin* (RTX) a capsaicinhez hasonló

hatásokat hoz létre, azonban különböző tesztekben annál több nagyságrenddel hatásosabbnak bizonyult (Szállási és Blumberg, 1999). Ugyanakkor ellentétben a capsaicinnel, az RTX képes a pulmonális chemoreceptorok deszenzitizációját a pulmonális chemoreflex előzetes aktivációja nélkül kiváltani patkányban. Ezekben a kísérleti adatokon alapult az a napjainkban megdőlni látszó feltételezés, miszerint a két vegyület hatása különböző, a capsaicin „C”, míg az RTX hatása „R” típusú receptoraltípusokon érvényesül, azonban valószínűbb az az elképzelés, hogy egyazon receptor külön kötőhellyel rendelkezik vanilloid, illetve resiniferanoid vegyületek számára.

Az analóg vegyületeken túl azonban napjaink fő feladata olyan endogén anyagok vizsgálata, melyek a capsaicin receptor endogén agonistájaként szerepelhetnek. Az endogén cannabinoidok mint neuromodulátorok fontos szerepet töltenek be a neurotranszmitterek felszabadulásának, illetve hatásainak befolyásolásán keresztül. Az endocannabinoidok a marihuana hatóanyagához, a D9-tetrahydrocannabinolhoz hasonló hatásokat képesek létrehozni, hatásukat két receptor altípuson, a CB1 és CB2 G-protein-kapcsolt receptorokon kifejtve. Ezek közül a CB1 receptor elsősorban központi, valamint perifériás idegrendszeri struktúrákon található, jelenlétét kimutatták a capsaicin-érzékeny peptiderg rostokon is. Aktivációja az adenil-cikláz, valamint a feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák gátlásához vezet. A cannabinoid és capsaicin-érzékeny rendszer kapcsolata az elmúlt évben került az érdeklődés középpontjába, miután igazolták, hogy az olvanil, mint capsaicin analóg képes az anandamid membrántranszportját gátolni. Az *anandamid* (N-arachidonylethanolamide), mint endogén cannabinoid az egyik legtöbbet vizsgált cannabinoid vegyület, egyes kísérleti adatok szerint a capsaicin VR1 receptort is képes aktiválni. Az anandamid izolált artérián capsazepinnel blokkolható vazodilatációt hoz létre CGRP felszabadításán keresztül a capsaicin-érzékeny afferenseken hatva, emellett patch-clamp kísérletekben szintén sikerült igazolni az anandamid izgató hatását a VR1 receptoron. Ugyanakkor ismeretes, hogy az anandamid a capsaicin-érzékeny primer afferenseken lévő CB1 receptoron gátló hatást fejt ki. Ezért érthető, hogy élénk vita bontakozott ki arról, szerepelhet-e az anandamid a cannabinoid receptor mellett a capsaicin receptor endogén ligandjaként is (Zygmunt és mtsai, 2000, Szolcsányi 2000).

AZ ÉRTEKEZÉS CÉLKITŰZÉSEI

Az értekezésben összefoglalt eredményeim a capsaicin-érzékeny szenzoros neuronok funkciójának felderítéséhez csatlakoznak és a munkacsoport korábbi munkáinak folytatását képezik. Elsősorban a szenzoros receptorokból felszabaduló szomatosztatin szisztémás gyulladásgátló hatását, valamint az anandamid, mint feltételezett endogén capsaicin receptor ligand szerepét vizsgáltam fiziológias és pathofiziológias körülmények között *in vivo* kísérletekben és *in vitro* peptidfelszabadulás közvetlen meghatározása révén.

I. Az első kísérletsorozatban arra kerestünk választ, hogy az exteroceptív területeken már igazolt szomatosztatin közvetítette szisztémás neurohumorális gyulladásgátló válasz kiváltható-e interoceptív területek felől is, a n. vagusok szenzoros rostjainak antidrómos ingerlésével patkányban, valamint tengerimalacban. Vizsgáltuk továbbá, hogy a capsaicin-érzékeny idegvégződések anti-, illetve orthodrómos ingerlése kivált-e anti-nociceptív hatást is.

II. Streptozotocinnal kiváltott kísérletes diabeteses neuropathiás modellben vizsgáltuk a capsaicin-érzékeny afferensek ingerlésével kiváltott szenzoros neuropeptid felszabadulás, neurogén gyulladás, valamint az előbb említett endogén gyulladásgátló jelenség eltéréseit.

III. Az endogén szomatosztatin mint gyulladásgátló mediátor ígéretes lehetőséget rejt magában. A kísérletsorozat célja az intézetünkben már vizsgált heptapeptid szomatosztatin analóg TT-232 hatásának további tanulmányozása volt, különös tekintettel a krónikus gyulladásos folyamatokra, a neuropeptid felszabadulásra, illetve a hatásmechanizmusra. Korábbi vizsgálatok nem tértek ki a gyulladás celluláris fázisára, ezért elemeztem az idegingerléssel felszabadított endogén neuropeptidek, valamint a TT-232 leukocyták akkumulációra kifejtett hatását.

IV. Tanulmányoztuk a capsaicin, illetve természetben előforduló capsaicin analóg vegyületek, mint az RTX és a piperin direkt izgató, illetve akut deszenzitizáló hatását *in vitro* körülmények között tracheapreparátumból felszabaduló szenzoros neuropeptidek (SP, CGRP, szomatosztatin) radioimmunoassay (RIA) meghatározása alapján.

V. A laboratóriumunkban korábban kifejlesztett specifikus RIA módszerek segítségével (Németh és mtsai, 1996, 1998) szenzoros neuropeptid felszabadulás mérése alapján módszereket dolgoztunk ki capsaicin receptorokon ható agonista és moduláló-antagonista hatások követése céljából. Vizsgáltuk szisztémásan adott RTX által kiváltott CGRP, valamint szomatosztatin felszabadulás dózis és időfüggését *in vivo* a plazma peptid szintek mérése útján. Az anandamid hatását a három szenzoros neuropeptid felszabadulására gyakorolt *in vitro* és *in vivo* hatások alapján elemeztük.

MÓDSZEREK

Kísérleteink java részét Wistar patkányokon végeztük, egy kísérletsorozatban azonban tengerimalacokat is használtunk. Altatáshoz natrium thiopenthalt (100 mg/kg, i.p.), vagy natrium pentobarbitalt (40 mg/kg, i.p.) a nociceptív reflexválaszok regisztrálásakor urethant (1 g/kg, i.p.) alkalmaztunk.

1. Neurogén gyulladás kiváltása antidrómos, illetve orthodrómos ingerléssel és plazma extravazáció meghatározása Evans kék akkumulációs módszerrel

Bőr nociceptorainak orthodrómos ingerlésére akutan denervált hátsó végtagokon, a lábháton 1 %-os mustárolaj helyi ecsetelését alkalmaztuk, ami a capsaicin-érzékeny C-polymodális nociceptorok szelektív kémiai izgatásával vált ki plazma extravazációt.

N. vagus antidrómos ingerlése: nyaki feltárásból végzett kétoldali n. vagus átmetaszt követően az idegek perifériás csonkjának antidrómos irányú elektromos ingerlését (20 V, 1 ms, 8 Hz, 20 min) alkalmaztuk atropin (2 mg/kg, i.v.), illetve hexamethonium (5 mg/kg, i.v.) előkezelésben, valamint cysteamin (280 mg/kg, s.c.) adása után 4 órával. *N. ischiadicus antidrómos ingerlése:* adrenerg neuronblokkoló guanethidin (8 mg/kg, i.p.) előkezelt és pipecuronium bromid (200 µg/kg, i.v.) segítségével relaxált állatokat tracheakanülön keresztül mesterségesen lélegeztettük. Az átmetaszt idegek perifériás csonkjait elektromosan ingereltük (20 V, 0.5 ms, 5 Hz, 5 min, valamint 30 V, 0.5 ms, 5 Hz, 20 min paraméterekkel patkányban, illetve tengerimalacban) a két oldalon 5 perces időkülönbséggel. Az utolsó gyulladáskeltő stimulus után 15 perccel az állatokat elvégeztettük, a n. ischiadicus innervációjának megfelelő bőrlebenyekben a plazma extravazáció mértékét az Evans kék módszerrel meghatároztuk. Az idegingerlést elvégeztük streptozotocinnal kezelt diabeteses patkányokban is.

Evans kék akkumulációs módszer: az állatok a gyulladás kiváltása előtt 10 perccel vénás kanülön keresztül Evans kék festéket kaptak 50 mg/kg dózisban, ami a plazma albuminhoz kötődve, a gyulladt szövetben a plazma extravazáció mértékével arányosan akkumulálódik. A lábháti bőrt lemetsztettük, majd 72 órás formamid extrakció után 620 nm-en fotométerrel meghatároztuk az extravazálódott festék mennyiségét µg/g egységben megadva.

2. *A plazma szomatosztatin illetve CGRP koncentrációjának meghatározása:* A plazma peptid szint meghatározásokat 12 órás éheztetési periódust követően végeztük artériás vérből. Az artériás vérmintavétel céljából a jobb oldali arteria carotisba kanült helyeztünk be.

Bilaterális elektromos vagusingerlés (20 V, 0.5 ms, 5 Hz, 5 min), abdominális vagusátmetés, illetve szisztémás capsaicin-előkezelés (1 %-os capsaicin s.c., három napig növekvő 30, 60, 90 mg/kg dózisban), antidrómos elektromos n. ischiadicus ingerlés (30 V, 0.5 ms, 5 Hz, 5 min), illetve perineurális capsaicin előkezelés hatására bekövetkező plazma *szomatosztatin* szint változásokat elemztük patkányban és tengerimalacban. Streptozotocin kezelt 4, illetve 8 hetes diabetes patkányokon is elvégeztük a n. ischiadicus ingerlést (20 V, 0.5 ms, 5 Hz, 5 min). A plazma *szomatosztatin* és *CGRP* szintek változását szisztémás RTX kezelés után több dózisban is megvizsgáltuk (0.1, 0.3, 0.6, 1 és 3 µg/kg, i.v.), 5 illetve 60 perc elteltével. Szisztémásan alkalmazva vizsgáltuk az endogén cannabinoid anandamid hatását a bazális plazmaszintekre (1 mg/kg és 100 µg/kg, i.v.), az RTX-kiváltotta neuropeptid felszabadulásra (10 és 100 µg/kg, i.v.), valamint szelektív CB1 antagonistá (SR141716A) előkezelés (100 µg/kg, i.v.) jelenlétében. Hasonló időparaméterekkel vizsgáltuk nociceptin (20 µg/kg, i.p.) azon dózisát, mely a neurogén plazma extravazációt előző kísérleteinkben szignifikánsan gátolta. Az elektromos ingerlés befejezése után 2 perccel, a kémiai ingeranyagok után 5, illetve 60 perccel artériás kanülön keresztül 3 ml vért nyertünk Trasylolt (1000 IU) és EDTA-t (6 mg) tartalmazó jégben hűtött kémcsövekbe és a plazma szomatosztatin és CGRP szinteket laboratóriumunkban kifejlesztett specifikus RIA módszerrel határoztuk meg.

3. *A szenzoros idegvégződések antidrómos, valamint orthodrómos ingerlésével kiváltott endogén anti-nociceptív hatás vizsgálata capsaicinnel kiváltott nociceptív cardiorespiratorikus reflexválaszokra:* a vérnyomás, szívfrekvencia, illetve légzésfrekvencia ismételt capsaicin (1 µg/kg, i.a.) adások hatására bekövetkező változásait a bal oldali artéria carotisba helyezett kanülön, valamint T-tracheakanülön keresztül, számítógéphez kapcsolt poligráf segítségével folyamatosan regisztráltuk. *N. ischiadicus antidrómos elektromos ingerlésének* (20 V, 0.5 ms, 5 Hz, 5 min) hatását vizsgáltuk capsaicin-kiváltotta vérnyomásválaszokra (mean arterial pressure, MAP) 10, 20, 30, 40, 50, 60 perccel az ingerlés után. *Orthodrómos kémiai ingerléssel kiváltott endogén anti-nociceptív hatás vizsgálatára* akut denerváció után a lábhátak bőrét paraffinolajban oldott 1 %-os mustárolajjal ecseteltük, kontroll csoportban a solvent (paraffinolajat) alkalmaztuk. A reflexválaszokat a paraffin-,

illetve mustárolajecsetelés előtt, és 5, 10, 15 perccel azt követően regisztráltuk Plazma szomatosztatin szint meghatározás (RIA) intraarteriális (1 µg/kg) capsaicin adás után 5 perccel történt.

4. Kísérletes diabetes mellitus: 50 mg/kg i.v. streptozotocinnal kezelt, 4, illetve 8 hetes. diabeteses patkányokon vizsgáltuk a neurogén gyulladásos válasz, szisztémás gyulladásgátló jelenség, valamint szenzoros neuropeptid felszabadulás érintettségét *in vivo*, illetve *in vitro* kísérletekben.

5. Neuropeptidek in vitro felszabadulásának vizsgálata: a natrium pentobarbitallal (Nembutal, 40 mg/kg, i.p.) narkotizált patkányok tracheáit kimetszettük és szervfürdőként (1.8 ml) 2-2 szervet 37 °C-os oxigenizált (95 % O₂ és 5 % CO₂) Krebs oldattal 60 percen át perfundáltuk (1 ml/perc). Az átáramlás leállítását után a kamrákban lévő oldatot 8 percenként 3-szor lecserélve frakciókat gyűjtöttünk (ingerlés előtti - ingerelt - ingerlés utáni). A peptidfelszabadulást elektromos téringerléssel vagy kémiai ingeranyagokkal váltottuk ki. A mintákat jégbe hűtött csövekbe gyűjtöttük, a kísérlet végén a légszűrődarabok nedves súlyát lemértük. A frakciók SP, CGRP és szomatosztatin koncentrációit intézetünkben kifejlesztett specifikus RIA módszerek segítségével határoztuk meg (Németh és mtsai, 1996, 1998, 1999), melyek érzékenysége a CGRP esetében 1 fmol/cső, a szomatosztatin és a SP-nél 2 fmol/cső. A peptidek mennyiségét fmol/mg egységben, nedves szövetsúlyra vonatkoztatva fejeztük ki.

A különböző kísérletsorozatokban vizsgáltuk a *neuropeptid felszabadulás* károsodását diabetes mellitusban és TT-232 szomatosztatin analóg hatását az elektromos ingerléssel kiváltott neuropeptid felszabadulásra. Elemeztük ezen kívül a szenzoros neuropeptidek felszabadulásának impulzusszám, illetve koncentrációfüggését különböző frekvenciával végzett elektromos (40 V, 0.1 ms, 0.5 Hz-200s, 2 Hz-50 s, 2 Hz-150 s, 10 Hz-30 s, illetve 10 Hz-120 s), valamint capsaicin analógokkal (capsaicin (10⁻⁸-10⁻⁵ M), RTX (10⁻¹⁰-10⁻⁷ M) és piperin (10⁻⁶-5x10⁻⁵ M)) végzett kémiai ingerlés esetén. Az RTX esetén egy közép dózisonál (10⁻⁸ M) 6 frakciót gyűjtöttünk, azaz a stimuláció után még 32 percig követtük a felszabadulás dinamikáját. Az *akut deszenzitizáció* létrehozása 30 perces capsaicin (10⁻⁸-10⁻⁵ M), illetve RTX (10⁻¹⁰-10⁻⁷ M) előmosással történt, ami után elektromos téringerléssel (40 V, 0.1 ms, 10 Hz, 120 s) váltottunk ki peptidfelszabadulást, és a gátló hatást az elektromos téringerlés kontroll értékéhez viszonyítva számoltuk.

6. *TT-232 szelektív szomatosztatin analóg hatását vizsgáltuk 1 %-os mustárolaj ecsetelésével kiváltott akut neurogén gyulladásra*, s.c. alkalmazva 1, 2, 4, illetve 6 órával a gyulladáskeltő stimulus előtt 10, 20, 40, 80, 160 valamint 320 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dózisban, illetve *Freund-adjuváns indukálta krónikus arthritisre*. A krónikus ízületi gyulladás kiváltására 0.1 ml komplett Freund-adjuvánt (elölt, szárított Mycobacteriumok paraffinban oldva) fecskendeztünk a bal talp bőrébe intraplantárisan, valamint a szisztémás hatás fokozása céljából az első két napon a faroktőbe. A térdízületi duzzanat mérése plethysmóméterrel történt a gyulladáskeltő anyag alkalmazását megelőzően, majd a 2., 5., 8., 12., 15. és 18. napon a kezelés alatt. A TT-232-t s.c. alkalmaztuk 2x100, 2x200, illetve 2x500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{nap}$ dózisban a 18 napos időszakban, a kontroll csoportot a TT-232 oldószerével kezeltük. Elemeztük a TT-232 hatását elektromos téringerléssel kiváltott *in vitro szenzoros neuropeptid felszabadulásra* is.

7. *Neutrophil leukocytá akkumuláció vizsgálata bőrben myeloperoxidáz módszerrel*: a gyulladáskeltő inger hatására a bőrben akkumulálódott neutrophilek számát a minták myeloperoxidáz tartalmának fotometriás mérésén keresztül kaptuk meg. A megfelelő akkumulációs idő letelte után az állatokat elvéreztettük, a talp, illetve lábháti bőrök megegyező felületű darabját kimetszettük, feldaraboltuk, és 2 ml, detergenst (0.5 % hexadecyl triethylammonium bromide) tartalmazó foszfát-pufferben homogenizáltuk. Ezután a homogenizátumot lecentrifugáltuk (10000g, 5 min, 4 °C), hogy a szövetdarabokat, valamint lipidfázist eltávolítsuk. A szupernatáns 1 ml-ét használtuk a myeloperoxidáz vizsgálathoz. A bőrminták myeloperoxidáz aktivitását “3,3',5,5' tetra methylbenzidine (TMB) liquid substrate system” (Sigma) hozzáadásával határoztuk meg. A kékülési reakció szobahőmérsékleten megy végbe, 30 perc alatt. Az optikai denzitást (OD) 620 nm-en mértük microplate reader-rel, 5 percenként. A reakció sebességéből ($\Delta\text{OD}/\text{idő}$), amely a minták myeloperoxidáz tartalmával arányos, meghatároztuk a neutrophil leukocyták számát.

Vizsgáltuk n. ischiadicus különböző paraméterekkel végzett elektromos ingerlésével felszabadított endogén neuropeptid hatását a bőrben létrehozható leukocytá akkumulációra, valamint antidrómos idegingerlés és TT-232 hatását carrageeninnel kiváltott leukocytá akkumulációra (100 μl , 1 %-os carrageenin oldat, intradermálisan).

EREDMÉNYEK, KÖVETKEZTETÉSEK

I./A. Nervus vagus, illetve nervus ischiadicus capsaicin-érzékeny szenzoros idegvégződéseiből felszabaduló endogén szomatosztatin szisztémás gyulladásgátló hatásának vizsgálata patkányban és tengerimalacban

Bilaterális vagusingerlés szignifikáns mértékben 36.45 ± 3.95 %-kal gátolja a láb hátakon kémiai stimulussal kiváltott második plazma extravazációt, ami cysteamin előkezeléssel jelentős mértékben kivédhető. Tengerimalacban a n. ischiadicus perifériás csonkjának antidrómos irányú elektromos ingerlése patkányban tapasztaltnal megegyező mértékű 45.46 ± 5.08 %-os gátló hatást fejtett ki. A n. vagusok perifériás csonkjának kétoldali elektromos ingerlése patkányban a plazma szomatosztatin szint 3.8-szeres (30.5 ± 1.65 fmol/ml), tengerimalacban 3.3-szeres (26.26 ± 3.16 fmol/ml) emelkedését eredményezte. A szisztémás capsaicin előkezelés a kétoldali vagusingerlésre bekövetkező plazma szomatosztatin szint emelkedést kivédte, a hasi vagusátmetzés azonban nem befolyásolta, ami bizonyítja, hogy az általunk mért peptidfelszabadulás valóban a capsaicin-érzékeny thoracalis szenzoros rostok aktivációjának eredménye volt. A n. ischiadicus perifériás csonkjának elektromos ingerlése a plazma szomatosztatin szint 3.5-szeres (26.98 ± 2.97 fmol/ml) emelkedését eredményezte tengerimalacban, ami perineurális capsaicin előkezelés után nem jött létre.

Kísérleteinkben elsőként sikerült bizonyítani, hogy a n. vagus perifériás csonkjainak elektromos ingerlésével paraszimpatikus blokádnak jelenlétében a szomatoszenzoros idegek ingerléséhez hasonlóan szisztémás gyulladásgátló hatás jön létre. A plazma szomatosztatin szint bilaterális vagusingerlés hatására bekövetkező jelentős növekedése, valamint a cysteamin előkezelés gyulladásgátlásra gyakorolt majdnem teljes blokkolása megerősítik azt a következtetést, hogy a hatást döntően az érzőidegvégzésekkel ingerlés hatására felszabaduló szomatosztatin közvetíti. A tengerimalacokon végzett kísérletek eredményeivel sikerült igazolnunk a patkányban már leírt endogén szisztémás neurogén gyulladásgátló jelenséget egy másik állatfajban is. A plazmaszint mérések eredményei ebben a fajban is megerősítették a capsaicin-érzékeny érzőidegvégzésekkel inger hatására felszabaduló idegi eredetű szomatosztatin mediátor szerepét. Az aktivált szenzoros idegvégzések tehát klasszikus afferens, illetve lokális efferens funkciójukon kívül egy új típusú neurohormonális választ is kiváltanak, az interoceptorokból és exteroceptorokból felszabaduló és a keringésbe jutó szomatosztatin szisztémás hatása révén.

I./B. A szenzoros idegvégződések antidrómos, valamint orthodrómos ingerlésével kiváltott endogén anti-nociceptív hatás vizsgálata

Bilaterális n. ischiadicus ingerlés a capsaicin-kiváltotta reflexes vérnyomásemelkedést 49.78 ± 0.92 %-kal gátolta az ingerlés kezdete után 10 perccel, és a válasz egy órán belül fokozatosan visszatért. A capsaicinnel kiváltott nociceptív cardiorespiratorikus reflexválaszok szignifikáns mértékben csökkentek a mustárolajecsetelés után 5, 10, 15 perccel. Intraarteriálisan adott $1 \mu\text{g/kg}$ capsaicin nem okozott szignifikáns emelkedést a plazma szomatosztatin szintjében az oldószerrel kezelt kontrollhoz viszonyítva 5 perccel az adás után (7.0 ± 0.54 fmol/ml illetve 6.9 ± 0.08 fmol/ml). Capsaicin tehát ebben a kis dózisban alkalmazva csak mint nociceptív inger szerepel.

Eredményeink igazolják, hogy a szenzoros idegrostok antidrómos elektromos, valamint orthodrómos kémiai ingerlése gátló hatást fejt ki a capsaicinnel, mint chemonociceptív ingerrel kiváltott nociceptív cardiorespiratorikus reflexválaszokra. Az alkalmazott antidrómos n. ischiadicus ingerlés, megegyező paraméterekkel az előzetes kísérletekben a plazma szomatosztatin szint közel négyszeres emelkedését váltotta ki, mely jelentős gyulladásgátló hatást eredményezett és az intraperitoneálisan adott szomatosztatin szintén gátló hatást fejtett ki a helyileg alkalmazott capsaicinnel vagy mustárolajjal kiváltott nociceptív reflexválaszokra. Mivel az ingerlések előtt a központi idegrendszerhez befutó afferens pályákat megszakítottuk, az aktivált helyek felől kiváltott reflexek, illetve a központi idegrendszer részvétele (“diffuse noxious inhibitory control”) kizárható. Ezek alapján arra következtettünk, hogy az anti-nociceptív hatást az aktivált perifériás szenzoros idegvégződésekből felszabaduló endogén peptidmediátor közvetíti. Feltételezésünk szerint ezért a hatásért is a capsaicin-érzékeny szenzoros idegvégződésekből felszabaduló szomatosztatin a felelős, de ennek bizonyítására további kísérletek szükségesek.

II. A capsaicin-érzékeny szenzoros idegvégződések izgatásával kiváltott neuropeptid felszabadulás, illetve gyulladásgátló hatás károsodása kísérletes diabetes mellitusban

Tracheapreparátumon végzett *in vitro* neuropeptid felszabadításos kísérleteink igazolták a három vizsgált peptid, a szomatosztatin, CGRP és SP felszabadulásának parallel károsodását diabetes mellitusban. Az egészséges állatokból származó tracheapreparátumokból az elektromos téringelés jelentős mértékű szintemelkedést eredményezett a második frakcióban, ezzel szemben diabeteses állatokban ez a válasz szignifikáns mértékben 39.2 ± 2.8 , 40.5 ± 3.2 , 47.3 ± 2.9 %-kal csökkent szomatosztatin, CGRP, illetve SP esetében. A primer

plazma extravazációs értékek mindkét diabeteses csoportban szignifikáns mértékben, a 4 hetekben 51.27 %-kal, a 8 hetekben 44.25 %-kal csökkentek. Míg normál állatokban a n. ischiadicus antidrómos elektromos ingerlésével kiváltott primér neurogén gyulladás 52.7±3.1 %-kal gátolta az ellenoldalon 5 perccel később hasonló módon kiváltott második plazma extravazációt, ez a gátló hatás diabeteses állatokban nem ért el szignifikáns mértéket 29.6±1.98 %, illetve 18.12±1.57 %-ra csökkent. Az éhgyomri plazma szomatosztatin szint igen határozott emelkedése volt észlelhető mindkét diabeteses csoportban, a normál kontrollokhöz viszonyítva. Ugyankor míg az egészséges állatokban a bilaterális ischiadicus ingerlés több mint négyszeres szomatosztatin szint emelkedést eredményezett (6.36±0.30-ről 28.30±2.6-re), diabeteses állatokban ez a válasz lecsökkent (11.68±1.37-ről 17.90±3.74-re a 4, valamint 16.76±3.85-ről 25.06±1.67-re (fmol/ml) a 8 hetekben), és nem ért el szignifikáns mértéket.

In vivo eredményeink alátámasztották az előzőekben már leírt bazális plazma szomatosztatin szint emelkedést, valamint a neurogén gyulladáshoz való válasz csökkenését insulinhiányos kísérletes diabetes mellitusban. Streptozotocinnal kiváltott kísérletes diabetesben a primer neurogén plazma extravazáció csökkenése, a jelen vizsgálatok alapján egyértelműen az említett gyulladáskeltő neuropeptidok (SP, CGRP) csökkent felszabadulásával magyarázható. A diabeteses perifériás neuropathiát kísérő neuropeptid deplécióra, illetve károsodott axontranszportra is vannak már adatok de önmagában a neuropeptid depléciója nem bizonyíték a funkcionális károsodás mellett. A fenti eredményeken kívül elsőként igazoltuk az egészséges állatokban leírt endogén gyulladásgátló válasz kiesését diabeteses patkányban, amelynek hátterében a hatást közvetítő idegi eredetű szomatosztatin felszabadulásának csökkenése áll.

III./A. TT-232 szelektív szomatosztatin analóg gyulladásgátló hatásának vizsgálata

TT-232 s.c. dózisfüggően gátolta a mustárolajjal kiváltott akut neurogén gyulladást. Az 1, 2, 4, 6 órás ID₃₅ értékek a következők: 20.26, 32.49, 39.86 és 78.22 µg/kg. A gyulladás kiváltását megelőző napon s.c. adott 2x500 µg/kg TT-232 a második injekció után 16 órával mustárolajcseteléssel kiváltott neurogén gyulladást még 52.09±3.8 %-kal gátolta. A krónikus ízületi gyulladásra a TT-232 szintén gátló hatást fejtett ki, mely jelentősebb mértéket a legnagyobb dózis (2x500 µg/kg naponta s.c.) esetében ért csak el. Az SP, CGRP és szomatosztatin izolált tracheából elektromos téringerlés hatására történő felszabadulását 200, 500 és 1500 nM TT-232 dózisfüggően gátolta. PTX a TT-232 gátló hatását kivédte, a

peptidfelszabadulást helyreállította, ami a G-protein függő receptoriális hatást igazolja. Önmagában a PTX, valamint a genistein nem befolyásolta a peptidfelszabadulást.

A TT-232 stabil, ciklikus, szintetikus heptapeptid szomatosztatin analóg hatékonyan gátolta mind az akut neurogén, mind a krónikus kevert ízületi gyulladási folyamatot. Kísérleteink alapján hatása subcután alkalmazás esetén dózistól függően hosszan tart. Hatását döntően az idegvégződéseken specifikusan a szomatosztatin receptorokon, nagy valószínűséggel az sst1/sst4 receptoraltípuson hatva, a neuropeptid felszabadulás gátlásán keresztül fejt ki. Bizonyított azonban a nem neurogén gyulladásra gyakorolt gátlása is, következésképpen a Freund-adjuvánssal kiváltott krónikus gyulladás csökkentésében feltehetően mind a neurogén, mind a nem neurogén gyulladást gátló hatása szerepet játszik. A TT-232 tirozin-kináz gátló aktivitása a gyulladásgátló hatásában valószínűleg nem játszik szerepet, mivel a potens tirozin-kináz gátló genistein nem fejtett ki hasonló hatást a neuropeptid felszabadulásra. Ezen eredmények jelentőségét az is hangsúlyozza, hogy jelenleg egyetlen olyan gyógyszer sincs, amely a neurogén gyulladási reakciókat megbízhatóan gátolni tudná. A TT-232 *in vivo* tesztekben hatékonyabbnak bizonyult mint a szomatosztatin, lebomlása lassúbb, ezáltal hatása tartósabb és szelektivebb is, mert endokrin hatásoktól mentes.

III./B. Endogén neuropeptidok, illetve TT-232 szomatosztatin analóg hatása neutrophil leukocyták akkumulációjára a bőrben

N. ischiadicus perifériás csomójának különböző paraméterekkel végzett antidrómos ingerlése nem váltott ki leukocyták akkumulációt a bőrben, sem az alacsony frekvenciával (1 Hz, 2 Hz) végzett folyamatos, sem a 10 Hz-es megszakított ingerlés esetén. N. ischiadicus egyoldali antidrómos ingerlésével felszabadított szomatosztatin az ellenoldalon carrageeninnel kiváltott neutrophil akkumulációt szignifikáns mértékben, 54.7 ± 3.8 %-kal gátolta. TT-232 (20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{óra}$, i.v.) kezelés a láb hát bőrén carrageeninnel kiváltott neutrophil akkumulációt 61.7 ± 5.9 %-kal gátolta, a solvens-kezelt kontrollokhoz viszonyítva.

A n. ischiadicus antidrómos ingerlésével felszabadított endogén neuropeptidok (SP, CGRP) tehát nem váltottak ki a bőrben neutrophil leukocyták akkumulációt. Irodalmi adatok szerint exogén SP, valamint CGRP a vasculáris endothelisejtek korai adhéziós molekuláinak (E-selectin, P-selectin) expresszióját, valamint proinflammátori citokinek felszabadulását is képes fokozni. Valószínű azonban, hogy az idegingerlésre ennél jóval kisebb mennyiségben felszabaduló endogén SP nem elégséges ilyen tartós hatások kiváltásához. Érdekes módon az

idegingerléssel felszabadított endogén szomatosztatin ezzel szemben képes volt gátolni a carrageeninnel kiváltott gyulladás sejtes fázisát már alacsony, 0.5 Hz-es ingerlés esetében. Hasonló hatást fejtett ki a TT-232 szomatosztatin analóg is, ami igazolja, hogy gyulladásgátló hatásának a már igazolt neuropeptid felszabadulást gátló hatáson kívül a gyulladásgátló komponense is van. A nem-szteroid gyulladásgátlókról ismert, hogy stimulálják egyes adhéziós molekulák (ICAM-I, CD18) expresszióját, melyek elősegítik a leukocyták kitapadását az endothélhez. A TT-232 leukocytákkumulációt gátló hatása újabb előnyt jelenthet az eddig használatos gyulladáscsillapítókkal szemben.

IV. Szomatosztatin, CGRP és SP felszabadulásának vizsgálata a capsaicin-érzékeny primer afferens neuronok végződéseiből elektromos ingerlés, valamint capsaicin analógok hatására

Eredményeink igazolták, hogy elektromos téringerlés esetén a peptidfelszabadulás a capsaicin-érzékeny idegvégződésekben a leadott impulzusszámtól függ, és 0.5-10 Hz-es tartományban nem függ az ingerlés frekvenciájától. A capsaicin analógokkal kapott eredmények igazolták, hogy mind a capsaicin, mind az RTX és a piperin akut izgató hatást fejt ki a capsaicin VR1 receptoron, koncentrációfüggő neuropeptid felszabadulást okozva. Az RTX már 10^{-10} M, a capsaicin 10^{-8} M koncentrációnál váltott ki szignifikáns emelkedést a frakciók SP, CGRP, illetve szomatosztatin koncentrációjában a bazális szinthez képest, míg a piperin 50-100 x gyengébbnek bizonyult. A 2. és 3. frakcióban együttesen mért abszolút peptidfelszabadulást tekintve RTX közel 100x hatékonyabbnak bizonyult a capsaicinnél. RTX hatása kinetikáját tekintve sokkal lassúbb, elhúzódó, jelentős peptidfelszabadulást okozva még a 3., 4. és 5. frakcióban a vegyület kimosása után is, ami feltehetőleg a lassú receptorkinetikából, valamint tartós depolarizációból ered.

A küszöbkoncentrációkhoz hasonlóan az akut deszenzitizációt tekintve is az RTX közel 100-szor hatásosabbnak bizonyult a capsaicinnél, azonban a vizsgált három peptid érzékenysége között eltérést tapasztaltunk. Capsaicin, illetve RTX a CGRP felszabadulását már $10^{-7}/10^{-9}$, a szomatosztatinét $10^{-6}/10^{-8}$, az SP-ét csak 10^{-5} , illetve 10^{-7} M koncentrációban védte ki. A capsaicin és az RTX tehát egyaránt legkisebb koncentrációban a CGRP, majd a szomatosztatin és végül az SP felszabadulását gátolta. A capsaicin kiváltotta klasszikus deszenzitizáció hátterében a szenzoros neuropeptidek, valamint a VR1 receptorok depléciója áll, azonban a capsaicin-deszenzitizáció megalapozott lehet a szenzoros neuropeptidek szintjének szignifikáns csökkenése nélkül is. A deszenzitizáció ezen általunk is vizsgált korai szakasza pontosan nem ismert, feltehetőleg a capsaicin VR1 receptor aktiválását követően

további intracelluláris folyamatok, pl. másodlagosan a feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák inaktivációja és más még nem tisztázott mechanizmusok játszhatnak szerepet. Ebben a szakaszban az efferens válasz hiánya tehát inkább valamiféle excitációs-szekréciónak hibának tulajdonítható. A capsaicin alkalmazása után később a szenzoros neuropeptidok depléciója majd degeneratív ultrastruktúrális elváltozások is megfigyelhetők, feltehetőleg a Na^+ - és Ca^{2+} -iontöbblet intraneuronális akkumulációja következtében. Jelenleg a klinikumban capsaicin deszenzitizáló hatását intravesicálisan alkalmazva az urológiában detrusor hyperreflexia, hyperreaktív, illetve hyperszenzitív hólyag esetén hasznosítják.

V. Szomatosztatin és CGRP felszabadulásának vizsgálata szisztémás resiniferatoxin kezelés hatására. Anandamid és nociceptin hatása a capsaicin-érzékeny idegvégződésekből történő neuropeptid felszabadulásra

Szisztémásan alkalmazott RTX dózisfüggően emeli a plazma szomatosztatin, illetve CGRP szinteket. A szomatosztatin küszöbdózisa alacsonyabb, 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ és a maximális hatás a plazma szint 22.2-szeres emelkedését eredményezte, ezzel szemben a CGRP küszöbe 0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, és a maximális emelkedés csekélyebb, 5.2-szeres volt. Kísérleteinkben tehát *in vivo* körülmények között is igazoltuk a szisztémásan alkalmazott RTX akut izgató hatását a capsaicin-érzékeny idegvégzések VR1 receptorain, ami feltehetőleg elsősorban a perivasculáris chemonocceptorokon és a polymodális nociceptorokon érvényesül. Az aktiváció hatására felszabaduló peptidek a szisztémás keringésbe is bejutva a plazma CGRP, illetve szomatosztatin szint jelentős, dózisfüggő emelkedését okozzák. A kidolgozott módszer alkalmas *in vivo* modell a capsaicin receptoron ható agonista, illetve antagonistá vegyületek szenzoros neuropeptid felszabadulásra kifejtett hatásának vizsgálatára a plazma neuropeptid szintjeinek követésén keresztül.

Anandamid és nociceptin gátló hatást fejtenek ki a capsaicin-érzékeny afferensekből kémiai ingerrel kiváltott neuropeptid felszabadulásra. Anandamid (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) mindkét peptid RTX-kiváltotta felszabadulását jelentős mértékben gátolta: a szomatosztatint 76.3 \pm 3.02 %-kal, a CGRP szint emelkedését 80.1 \pm 4.56 %-kal csökkentette. A kisebb dózis (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) azonban csak a szomatosztatin esetén ért el szignifikáns mértéket. Az SR141716A szelektív CB1 antagonistával végzett előkezelés mindkét peptid esetén szignifikáns mértékben képes volt csökkenteni az anandamid gátló hatását. Önmagában alkalmazva az anandamid nagyobb dózisa (1 mg/kg, i.v.) a szomatosztatin bazális plazmaszintjét csökkentette a kontrollhoz képest (5.02 \pm 0.56-ről 3.52 \pm 0.16-re, fmol/ml), a CGRP esetén azonban nem

tapasztaltunk szignifikáns eltérést. Anandamid (10^{-5} M) *in vitro* körülmények között mindhárom neuropeptid bazális felszabadulását szignifikáns mértékben csökkentette, melyet PTX a G-protein út gátlásán keresztül helyreállított. Ez arra utal, hogy az anandamid ezt a hatását a CB1 receptoron és nem direkt ioncsatornákon fejtí ki. Ezzel szemben nagy koncentrációban alkalmazva (5×10^{-4} M) az anandamid igen jelentős neuropeptid felszabadulást eredményezett, ez körülbelül a 10^{-5} M capsaicin hatásának felelt meg, ami már neurotoxicitásra utal. Nociceptin (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) szignifikáns mértékben 46.8 ± 3.8 %-kal gátolta az RTX-kiváltotta szomatosztatin felszabadulását, míg a CGRP esetén 38.5 ± 3.4 %-os gátlást tapasztaltunk.

Bizonyított, hogy az anandamid képes mindkét receptort, a CB1 és a VR1 receptort is aktiválni, egymást ellensúlyozó hatásokat kiváltva. Feltételezhető, hogy az anandamid capsaicin VR1 receptor aktiváló hatása a CB1 receptorokon kifejtett gátló hatás következtében nem tud manifesztálódni, ezért az anandamid capsaicin VR1 receptor endogén ligandjaként való funkciója nem látszik elfogadhatónak. A nociceptin szintén gátolta a kémiai ingerrel kiváltott neuropeptid felszabadulást, feltehetőleg az idegvégződéseken elhelyezkedő ORL1 receptor aktiválása útján. Ebben a nociceptin eltér az opioid vegyületektől, mivel a klasszikus μ és δ receptor agonisták csak az elektromos ingerrel kiváltott peptidfelszabadulást gátolják. Irodalmi adatok szerint a nociceptin gátolja az alacsony feszültségű, T-típusú Ca^{2+} csatornák működését, valószínűleg ezzel a mechanizmussal gátolva az idegvégződésekből stimuláció hatására történő neuropeptid felszabadulást is.

LEGFONTOSABB ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Patkányban a szomatoszenzoros idegekhez hasonlóan, a n. vagusok capsaicin-érzékeny szenzoros rostjainak antidrómos ingerlése az aktivált idegvégződésekből felszabaduló szomatosztatin által közvetített szisztémás gyulladásgátló hatást hoz létre. Hasonló endogén gyulladásgátló hatás váltható ki tengerimalacban a n. ischiadicus szomatoszenzoros idegvégződéseinek ingerlésével. A capsaicin-érzékeny idegvégzések antidrómos, valamint orthodrómos aktivációjával felszabadított szomatosztatin anti-nociceptív hatást is kivált.

2. Kísérletes diabeteses neuropathiában bizonyítottuk a SP, CGRP, valamint szomatosztatin felszabadulás csökkenését *in vitro*. Igazoltuk emellett a capsaicin-érzékeny szenzoros rostokból a szomatosztatin felszabadulás csökkenését *in vivo*, valamint az így kiváltott endogén gyulladásgátló hatás károsodását is.

3. TT-232 heptapeptid szomatosztatin analóg vegyület gyulladásgátló hatást fejt ki akut neurogén, valamint krónikus ízületi gyulladással járó folyamatokra egyaránt, hatását feltehetően döntően a neuropeptid felszabadulás gátlásán keresztül elérve a capsaicin-érzékeny idegvégzések sst1/sst4 receptorain. TT-232 gátolta a carrageenin gyulladás leukocita akkumulációs fázisát is. Hasonló gátló hatással rendelkezett az antidrómos idegingerléssel felszabadított endogén szomatosztatin. Ingerléssel felszabadított endogén neuropeptidekkel (SP, CGRP) azonban nem sikerült leukocita akkumulációt kiváltanunk a bőrben.

4. Capsaicin, RTX és piperin, illetve elektromos téringerlés a capsaicin-érzékeny idegvégzésekben tárolt szomatosztatin, CGRP, valamint SP felszabadulását váltják ki koncentráció-, illetve impulzusszámfüggő módon. Az elektromos ingerléssel előidézett peptidfelszabadulás 0.5-10 Hz frekvenciatartományban azonos impulzusszám esetén azonos mértékű. RTX-szel, valamint capsaicinnel kiváltott akut deszenzitizáció szintén koncentrációfüggő és képes kivédeni mind az elektromos téringerlés-, mind a capsaicin-kiváltotta neuropeptid felszabadulást. Mindkét anyag után kialakuló deszenzitizáció legalacsonyabb koncentrációban csak a CGRP felszabadulást gátolja, majd a szomatosztatinét és végül legnagyobb koncentrációban az SP-ét.

5. Szisztémásan alkalmazott RTX a capsaicin-érzékeny chemonociceptorok izgatásával a plazma szomatosztatin és CGRP szint dóziszfüggő, rapid, de hosszantartó emelkedését váltja ki. Az így kiváltott neuropeptid felszabadulást az anandamid és a nociceptin gátolja. *In vivo* neuropeptid felszabadulás alapján kapott eredményeink tehát nem

támogatják azt a koncepciót, mely szerint az anandamid a capsaicin VR1 receptor funkcionális hatásokért felelős endogén ligandja lenne.

PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

I. EREDETI KÖZLEMÉNYEK

A./ Nemzetközi folyóiratok

1. Németh J., Helyes Zs., Oroszi G., **Thán M.**, Pintér E., Szolcsányi J.: Inhibition of nociceptin on sensory neuropeptide release and mast cell-mediated plasma extravasation in rats.
Eur. J. Pharmacol., 347, 101-104, 1998.
2. Németh J., Szilvássy Z., **Thán M.**, Oroszi G., Sári R., Szolcsányi J.: Decreased sensory neuropeptide release from trachea of the rat with streptozotocin-induced diabetes.
Eur. J. Pharmacol., 369, 221-224, 1999.
3. Németh J., **Thán M.**, Sári R., Peitl B., Oroszi G., Farkas B., Szolcsányi J., Szilvássy Z.: Impairment of neurogenic inflammatory and anti-inflammatory responses in diabetic rats.
Eur. J. Pharmacol., 386, 83-88, 1999.
4. Helyes Zs., **Thán M.**, Oroszi G., Pintér E., Németh J., Kéri Gy., Szolcsányi J.: Anti-nociceptive effect induced by somatostatin released from sensory nerve terminals and by synthetic somatostatin analogs in the rat.
Neurosci. Lett., 278, 185-188, 2000.
5. **Thán M.**, Németh J., Szilvássy Z., Pintér E., Helyes Zs., Szolcsányi J.: Anti-inflammatory effect of somatostatin released from capsaicin-sensitive vagal and sciatic sensory fibres of the rat and guinea-pig.
Eur. J. Pharmacol., 399, 251-258, 2000.
6. Németh, J., **Thán, M.**, Szolcsányi, J.: Anandamide induced inhibition on the release of CGRP and somatostatin evoked by resiniferatoxin in the rat *in vivo*.
Brit. J. Pharmacol., (közlésre benyújtva) 2000.

B./ Angol nyelvű hazai folyóiratok

1. Németh J., Oroszi G., **Thán M.**, Helyes Zs., Pintér E., Farkas B., Szolcsányi J.: Substance P radioimmunoassay for quantitative characterization of sensory neurotransmitter release.
Neurobiology, 7, 437-444, 1999.

II. FOLYÓIRATOKBAN MEGJELENT ELŐADÁSKIVONATOK

A./ Külföldi folyóiratok, kongresszusi kiadványok

1. Szolcsányi J., Pintér E., Helyes Zs., Németh J., Oroszi G., **Thán M.**, Kéri Gy.: Anti-inflammatory effect induced by TT-232, a novel heptapeptide somatostatin analog.
Regul. Peptides, 80, 137, 1999.

2. **Thán M.**, Németh J., Helyes Zs., Szilvássy Z., Pintér E., Szolcsányi J.: Somatostatin mediated systemic anti-inflammatory effect induced by antidromic vagal and sciatic nerve stimulation.
Regul. Peptides, 80, 137, 1999.
3. **Thán M.**, Németh J., Szilvássy Z., Oroszi G., Szolcsányi J.: Systemic anti-inflammatory effect mediated by somatostatin released from activated sensory vagal nerve terminals in rats and guinea-pigs.
Fundam. Clin. Pharmacol., 13, 328s, 1999.
4. Pintér E., Helyes Zs., Németh J., Oroszi G., **Thán M.**, Kéri Gy., Szolcsányi J.: Pharmacological analysis of the anti-inflammatory effect induced by TT-232, a novel heptapeptide somatostatin analog.
Fundam. Clin. Pharmacol., 13, 36s, 1999.
5. **Thán M.**, Pintér E., Brain S.D., Rawlingson A., Szolcsányi J.: Local and systemic effect of sciatic nerve stimulation on cutaneous neutrophil accumulation in the rat hindpaw.
Regul. Peptides, 89, 84, 2000.
6. Németh J., **Thán M.**, Peitl B., Oroszi G., Szolcsányi J., Szilvássy Z.: Impaired anti-inflammatory response and decreased sensory neuropeptide release in streptozotocin-induced diabetes.
J. Physiol. London, (közlésre elfogadva) 2000.

B./ Angol nyelvű hazai folyóiratok

1. **Thán M.**, Németh J., Szilvássy Z., Oroszi G., Szolcsányi J.: Role of circulating somatostatin of neural origin in the development of systemic anti-inflammatory effect induced by local neurogenic inflammation in rats and guinea-pigs.
Neurobiology, 7, 397, 1999.
2. Németh J., **Thán M.**, Helyes Zs., Oroszi G., Pintér E., Szolcsányi J.: Substance P radioimmunoassay for quantitative characterization of sensory neurotransmitter release.
Neurobiology, 7, 360, 1999.
3. **Thán M.**, Németh J., Helyes Zs., Oroszi G., Pintér E., Szolcsányi J.: Release of somatostatin and CGRP from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in vitro and in vivo.
Neurobiology, (közlésre elfogadva) 2000.
4. Németh J., **Thán M.**, Sari R., Peitl B., Oroszi G., Szolcsányi J., Szilvássy Z.: Impairment of neurogenic inflammation elicited systemic anti-inflammatory response in experimental diabetes.
Neurobiology, (közlésre elfogadva) 2000.
5. Helyes Zs., **Thán M.**, Németh J., Pintér E., Kéri Gy., Szolcsányi J.: Mechanism of the inhibitory effect induced by TT-232 and anandamide on sensory neuropeptide release.
Neurobiology, (közlésre elfogadva) 2000.

ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK LISTÁJA

1. **Thán M.**, Németh J., Oroszi G., Szilvássy Z., Szolcsányi J.: Szisztémás gyulladáscsökkentő hatás indukciója a n. vagus capsaicin-érzékeny rostjainak antidrómos ingerlésével.
Magyar Élettani Társaság LXIII. Vándorgyűlése, Debrecen, 1998. július 8-11.
2. **Thán M.**, Oroszi G.: Szisztémás gyulladáscsökkentő hatás kiváltása a n. vagus capsaicin-érzékeny rostjainak antidrómos ingerlésével.
Doktoranduszok II. Országos Konferenciája, Debrecen 1998. augusztus 30-szeptember 1.
3. **Thán M.**, Németh J., Szilvássy Z., Oroszi G., Szolcsányi J.: Role of circulating somatostatin of neural origin in the development of systemic anti-inflammatory effect induced by local neurogenic inflammation in rats and guinea-pigs.
Magyar Idegtudományi Társaság VI. Konferenciája, Harkány-Pécs, 1999. január 27-30.
4. Németh J., **Thán M.**, Helyes Zs., Oroszi G., Pintér E., Szolcsányi J.: Substance P radioimmunoassay for quantitative characterization of sensory neurotransmitter release.
Magyar Idegtudományi Társaság VI. Konferenciája, Harkány-Pécs, 1999. január 27-30.
5. **Thán M.**, Helyes Zs.: A vagus érzőidegvégződéseiből felszabaduló somatostatin szisztémás gyulladásgátló hatása.
Pécsi Akadémiai Bizottság- Neurobiológiai Munkabizottság, "Agykutatás Hete" Pécs, 1999. március 15-21."
6. Helyes Zs., **Thán M.**: A capsaicin-érzékeny érzőidegvégződésekből felszabaduló mediátor antinociceptív hatása.
Pécsi Akadémiai Bizottság- Neurobiológiai Munkabizottság, "Agykutatás Hete" Pécs, 1999. március 15-21."
7. Szolcsányi J., Pintér E., Helyes Zs., Németh J., Oroszi G., **Thán M.**, Kéri Gy.: Anti-inflammatory effect induced by TT-232, a novel heptapeptide somatostatin analog.
9th Meeting of the European Neuropeptide Club, Ferrara, Olaszország, 12-15 May, 1999.
8. **Thán M.**, Németh J., Helyes Zs., Szilvássy Z., Pintér E., Szolcsányi J.: Somatostatin mediated systemic anti-inflammatory effect induced by antidromic vagal and sciatic nerve stimulation.
9th Meeting of the European Neuropeptide Club, Ferrara, Olaszország, 12-15 May, 1999.
9. **Thán M.**, Németh J., Szilvássy Z., Oroszi G., Szolcsányi J.: Systemic anti-inflammatory effect mediated by somatostatin released from activated sensory vagal nerve terminals in rats and guinea-pigs.
2nd European Congress of Pharmacology, Budapest, Hungary, 3-7 July, 1999.
10. Pintér E., Helyes Zs., Németh J., Oroszi G., **Thán M.**, Kéri Gy., Szolcsányi J.: Pharmacological analysis of the anti-inflammatory effect induced by TT-232, a novel heptapeptide somatostatin analog.
2nd European Congress of Pharmacology, Budapest, Hungary, 3-7 July, 1999.

11. **Thán M.**, Németh J., Szilvássy Z., Szolcsányi J.: Szisztémás gyulladáscsökkentő hatás indukciója a nervus vagus illetve a nervus ischiadicus capsaicin-érzékeny szenzoros rostjainak antidrómos ingerlésével patkányban és tengerimalacban. Az idegi eredetű szomatosztatin mediátor szerepe.

Tüdőgyógyászati, Allergológiai és Immunológiai Megbetegedések (TAIM) Nemzetközi Alapítvány V. Tudományos Konferenciája, Debrecen, 1999. augusztus 26-27. II. díjat nyert pályamunka.

12. **Thán M.**, Németh J., Helyes Zs., Oroszi G., Pintér E., Szolcsányi J.: Release of somatostatin and CGRP from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in vitro and in vivo. MITT 2000, Magyar Idegtudományi Társaság Konferenciája, Budapest, 2000. január 19-22.

13. Németh J., **Thán M.**, Sari R., Peitl B., Oroszi G., Szolcsányi J., Szilvássy Z.: Impairment of neurogenic inflammation elicited systemic anti-inflammatory response in experimental diabetes.

MITT 2000, Magyar Idegtudományi Társaság Konferenciája, Budapest, 2000. január 19-22.

14. Helyes Zs., **Thán M.**, Németh J., Pintér E., Kéri Gy., Szolcsányi J.: Mechanism of the inhibitory effect induced by TT-232 and anandamide on sensory neuropeptide release.

MITT 2000, Magyar Idegtudományi Társaság Konferenciája, Budapest, 2000. január 19-22.

15. **Thán M.**, Pintér E., Brain S.D., Rawlingson A., Szolcsányi J.: Local and systemic effect of sciatic nerve stimulation on cutaneous neutrophil accumulation in the rat hindpaw.

10th Annual Meeting of the European Neuropeptide Club, Innsbruck, Németország, 10-13 May, 2000.

16. Németh J., **Thán M.**, Peitl B., Oroszi G., Szolcsányi J., Szilvássy Z.: Impaired anti-inflammatory response and decreased sensory neuropeptide release in streptozotocin-induced diabetes.

Joint Meeting of the Physiological Society and the Hungarian Physiological Society, Budapest, Hungary, 27-29 May, 2000.