

Doktori (PhD) értekezés tézisei

A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződés, a TRPV1 és a szomatosztatin sst₄ receptorok szerepének vizsgálata légúti gyulladásmodellekben

Elekes Krisztián



Elméleti Orvostudományok – Neurofarmakológiai program

Programvezető: Prof. Szolcsányi János

Témavezető: Dr. Helyes Zsuzsanna

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Pécs

2007

I. BEVEZETÉS

Neurofarmakológiai kutatócsoportunk évtizedek óta a nocicepció és a gyulladás farmakológiájának témakörében folytat kutatásokat, amelyek elsősorban a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződések szerepének a felderítésére irányulnak. Ezek komplex szabályozó funkciójára az eddigi kísérletek alapján a bőr és az ízületi gyulladásos folyamatok, illetve a gyulladásos és neuropátiás fájdalommechanizmusok számos bizonyítékot szolgáltatottak (Szolcsányi, 2004). Mivel korábbi adatok arra utaltak, hogy az érzőideg-végződéseknek és a belőlük felszabaduló szenzoros neuropeptideknek jelentős szerep tulajdonítható a légúti gyulladások kialakulásában, PhD munkám témájául azt a feladatot kaptam, hogy a nemzetközi irodalom alapján kidolgozzam azokat az *in vivo* egér modelleket, melyek segítségével szisztematikus kísérleteket végezhetünk.

A TRPV1 receptor, működését tekintve, egy nem szelektív kationcsatorna, aktiválásakor Na^{2+} és Ca^{2+} ionok áramlanak a sejtbe, melyet K^{+} ion kiáramlás és passzív Cl^{-} ion beáramlás követ. Ennek eredményeképpen akciós potenciál generálódik, melynek következménye az érzőműködés és a nocicepció kialakulása. A Ca^{2+} ionok hatására pedig szenzoros neuropeptidek szabadulnak fel az idegvégződésből. Tartós aktiváció következményeképpen a hosszan nyitvatartott ioncsatornán keresztül beáramló nagy mennyiségű Ca^{2+} ion hatására létrejön az ún. kapszaicin-deszenzibilizáció, mely az érzőideg végződéseket a kémiai ingerekkel szemben érzéketlenné teszi anélkül, hogy elektromos stimulusokkal szemben válaszkészségük megváltozna (Bevan és Szolcsányi, 1990). A TRPV1 receptort kapszaicinen kívül forró ingerek és kémiai ingerek széles skálája képes aktiválni. Számos más növényi eredetű vanilloid, például a marokkói kaktuszféleből kivont resiniferatoxin (RTX), is stimulálja a receptort. Ezen túlmenően még többféle endogén fájdalom- és gyulladáskeltő molekula, például endokannabinoidok közé tartozó anandamid, protonok, illetve az arachidonsavból oxidációval keletkező termékek és a magas – 42 °C feletti – hőinger ugyancsak aktivátorai a receptornak (Tominaga és mtsai, 1998).

A légutakban a kapszaicin-szenzitív peptiderg afferensek nem csak érző funkciókat közvetítenek, hanem neuropeptidek - mint például a kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP), tachykininek, illetve P-anyag (SP) - kibocsátásával lokális bronchokonstriktor (Szolcsányi és Barthó, 1982) és gyulladáskeltő hatással is rendelkeznek (Lundberg, 1995; Maggi, 1995; Szolcsányi, 1996). Ezen neurogén mechanizmusnak a gyulladásos reakciókban van szerepe, ahol az irritáns ágenseknek a skálája igen széles, mint például a cigaretta füst, a SO_2 , az éter, stb. (Barnes, 2001; Lundberg, 1995; McDonald, 1987).

A kapszaicin-érzékeny, TRPV1 receptort expresszáló, érzőideg-végződések különlegessége, hogy a klasszikus érző illetve fájdalomérző (afferens) működésen túl lokális és szisztémás efferens funkciókkal is rendelkeznek a belőlük közvetlenül, reflex nélkül felszabaduló szenzoros neuropeptidek közvetítésével. A CGRP és a tachykininek, mint a SP, a neurokinin A (NKA) és a neurokinin B (NKB) a tüdőben különféle stimulusok (gyulladásos mediátorok, protonok, neurotoxinok, cigarettafüst) hatására exocitózissal szabadulnak fel a tüdő afferens rostjaiból, bár tachykininek (elsősorban SP) az immunrendszer sejtjeiben is szintetizálódnak. A CGRP és a SP értágulatot, plazmafehérjék szövetekbe történő kiáramlását (duzzadást) és gyulladásos sejt aktivációt okoznak az innervált területen, amelyet neurogén gyulladásnak nevezünk. Ez a mechanizmus jelentősen hozzájárul a bronchokonstrikciónak és a nyálkahártya ödémához, így a fokozott légúti ellenállás kialakulásához (Lundberg, 1995). A SP serkenti továbbá az erek proliferációját, ez a hatás tehető felelőssé az asztmában szenvedők légútaiban tapasztalható megváltozott érstruktúráért. A SP és az NKA a tüdő fibroblasztjait is stimulálja, ezzel hozzájárul az asztmásokban tapasztalt fibrotikus elváltozásokhoz. A tachykininek az immun- és gyulladásos sejtek működését is serkentik, a P-anyag nem receptor mediált hatással degranulálja a hízósejteket és az eosinophil granulocitákat, valamint serkenti a kemotaxist. A tachykininek fokozzák az alveoláris makrofágokban a gyulladásos citokinek (pl. IL-6) termelését. Az NK1 receptorok elsősorban a neurogén gyulladásos reakciókban játszanak szerepet (szekréció fokozódás, vazodilatáció, plazma extravazáció, stb), az NK2 receptorok inkább a bronchokonstrikciónak és a bronchiális hiperreaktivitásnak fontosak (Advenier és mtsai, 1997; Joos és mtsai, 2001; Lagente és Advenier, 1998).

Munkacsoportunk egy évtizedes munkájával számos kísérleti bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy ugyanezen idegvégződésekben az előzőekben említett gyulladáskeltő neuropeptidek mellett szomatosztatin (SOM) is felszabadul, amely a keringésbe jutva szisztémás gyulladásgátló és antinociceptív hatásokat fejt ki (rev. Szolcsányi és mtsai, 2004). A SOM 14 és 28 aminosavat tartalmazó ciklikus peptid, amelyet neuronok, neuroendokrin, gyulladásos és immunsejtek termelnek. A SOM jelenlétét az elsődleges érző neuronokban már évtizedekkel ezelőtt leírták. A szomatosztatin gátló hatása öt különböző G_i-proteinhez kötött membránreceptoron (sst) keresztül valósul meg (Hoyer és mtsai, 1995; Pintér és mtsai, 2006). E receptorok szintetikus szomatosztatin analóg kötésképeségük alapján két csoportra oszthatók: a SRIF1 csoport az sst₂, sst₃ és sst₅ receptorokat tartalmazza, amelyek nagy affinitással képesek kötni az oktapeptid analógokat, míg a SRIF2 csoport az sst₁ és sst₄ receptorokat foglalja magába, melyekhez ezen analógok csekély affinitást mutatnak (Hoyer és

mtsai, 1995; Pintér és mtsai, 2006). Az irodalmi adatok alapján igazolt, hogy az endokrin hatásokat a SRIF1 család tagjai közvetítik, eddigi eredményeink azonban arra utaltak, hogy a SOM gyulladáscsökkentő és antinociceptív hatásai a SRIF2 receptorokon, elsősorban az sst₄ receptorokon keresztül valósulnak meg (rev. Pintér és mtsai, 2006; Szolcsányi és mtsai, 2004). Az sst₄ receptorok lokalizációjára és funkciójára vonatkozóan azonban kevés irodalmi adat áll rendelkezésre.

Új típusú gyulladásgátló és fájdalomcsillapító gyógyszerek kifejlesztéséhez stabil, elsősorban sst₄-szelektív agonisták lehetnek ígéretesek. Ilyen a TT-232, amely egy stabil ciklikus heptapeptid analóg (MTA, Peptid Biokémiai Kutató Csoport, Orvosi Kémia, Semmelweis Egyetem, Budapest). E vegyület, amely az sst₄ receptor iránt mutatta a legnagyobb affinitást (Helyes és mtsai, 2006), nem gátolja a növekedési hormon, ill. a gasztrin szekrécióját, viszont erős anti-proliferatív, gyulladásgátló és anti-nociceptív hatással rendelkezett több kísérleti modellben (rev. Helyes és mtsai, 2006). Egy új szulfonamidopeptidomimetikum, a J-2156 (Juvantia Pharma, Turku, Finnország), a szomatosztatin receptor ligandok kémiaiailag egy új osztályába tartozik. A J-2156 nM-os affinitással rendelkezik az emberi sst₄ receptor iránt, amely a natív szomatosztatinnál is erősebb. Ez 400-szor nagyobb szelektivitást jelent a többi humán szomatosztatin receptor altípushoz viszonyítva (Engstrom és mtsai, 2005).

II. CÉLKITŰZÉSEK

- 1.) Mivel az irodalomban a kapszaicin-érzékeny afferensek légúti gyulladásban betöltött szerepére vonatkozóan ellentmondást találtunk, kísérletsorozatunk első célkitűzése az volt, hogy megvizsgáljuk e rostok és a gyulladáskeltő szenzoros neuropeptidek funkcióját endotoxinnal kiváltott akut intersticiális légúti gyulladásban és következményes bronchiális hiperreaktivitásban egérben.
- 2.) A TRPV1 génhíányos egerekkel végzett előzetes kísérleteink alapján e receptor komplex szabályozó molekulának bizonyult bőr és ízületi gyulladás, valamint neuropátia modellekben. Ezért következő célunk az volt, hogy tanulmányozzuk ezen ioncsatorna reguláló szerepét endotoxin-indukálta légúti gyulladásban és gyulladással járó válaszkészség fokozódásban.
- 3.) Előző kísérletsorozatunkban kapott eredményeink azt bizonyították, hogy a tüdő TRPV1 receptorainak aktivációjával szomatosztatin szabadul fel, amely gátolja a gyulladást

folyamatokat és a hiperreaktivitást. Feltételeztük, hogy e gátló hatásokat az sst₄ receptor közvetíti, de e receptor lokalizációjára és funkciójára vonatkozóan kevés irodalmi adat állt rendelkezésre. Ezért munkánk harmadik célja az volt, hogy megvizsgáljuk az sst₄ mRNS és a receptor fehérje expresszióját és gyulladás hatására történő változását egértüdőben, továbbá a receptor funkcióját endotoxinnal kiváltott légúti gyulladásban sst₄ génhiányos egerek segítségével.

4.) Mivel az sst₄ receptor expresszióját molekuláris biológiai és immunhisztokémiai módszerekkel bizonyítottuk az egér tüdőben, illetve szelektív sst₄ receptor agonisták gyulladásgátló hatását más modellekben is igazoltuk, kísérletsorozatunk következő célja, hogy a heptapeptid analóg TT-232 és a peptidomimetikum J-2156 vegyületeket endotoxinnal kiváltott akut, és ovalbuminnal előidézett krónikus légúti gyulladás egérmodellekben is megvizsgáljuk.

III. KÍSÉRLETI MODELLEK, VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

A kísérleteket nőstény CD1, Balb/c illetve C57Bl/6 egereken végeztük. Két kísérletsorozatban a C57Bl/6 törzsből előállított TRPV1 receptor-gén hiányos (TRPV1^{-/-}; Dr. J.B. Davis, GlaxoSmithKline, Harlow, U.K.) illetve sst₄ receptor knock out (sst₄^{-/-}; Dr. Piers Emson, Laboratory of Molecular Neuroscience, The Babraham Institute, Cambridge, U.K.) egereket és vad típusú megfelelőiket (TRPV1^{+/+}, sst₄^{+/+}) használtuk.

Endotoxinnal kiváltott akut légúti gyulladás modell

Kísérleteink nagy részében az endotoxinnal (lipopoliszacharid, LPS) kiváltott akut intersticiális pneumonitis modellt használtuk. Az intranazálisan adott LPS-sel a tüdőben lokalizáltan váltható ki gyulladásos reakció anélkül, hogy más szervekben szisztémás károsodást okoznánk. A szubakut légúti gyulladást éteres altatásban 60 µl *Escherichia coli* lipopoliszacharid (LPS; 167 µg/ml) intranazális alkalmazásával idéztük elő 24 órával a légúti hiperreaktivitás meghatározása előtt.

Ovalbuminnal kiváltott krónikus légúti gyulladás modell

Egerekben az egyik legáltalánosabb krónikus légúti gyulladás modell az ovalbuminnal (OVA) kiváltott asztma modell. Balb/c egereket az 1. és a 14. napon 20 µg i.p. ovalbuminnal szenzitiváltunk (100 µl; 30 µl AlumImject-et tartalommal az egyenletes antigén felszívódás

érdekében). Az első szenzitizáló injekciót követően a 28. 29. és a 30. napon 5 %-os OVA oldat 20 perces inhaláltatásával (4 ml/5 állat, 0.2 ml/perc) váltottuk ki a légúti gyulladást.

Előkezelések, kezelések

Az első kísérletsorozatban a kapszaicin-érzékeny idegvégződések tartós inaktiválására egy állatsortot előkezeltünk a TRPV1 receptor agonista resiniferatoxin (RTX) nagy dózisainak ismételt adásával (deszenzitizálás). Az RTX-et három egymást követő napon, a nyaki régióba s.c. adtuk 30, 70, 100 µg/kg dózisokban, altatott állatoknak. Az így deszenzibilizált egereket 14 nappal a kezelés után vontuk be a kísérletekbe. Más csoportokat NK1 receptor antagonistával (SR 140333, 160 µg/kg s.c.), NK2 receptor antagonistával (SR 48968; 160 µg/kg s.c.), illetve CGRP1 receptor antagonistával (CGRP(8-37); 160 µg/kg s.c.) kezeltünk háromszor, 30 perccel az LPS beadása előtt, illetve 8 és 23 órával utána.

A második kísérletsorozatban a TRPV1 receptor aktivációval felszabaduló SOM hatásának gátlására a szomatosztatin receptor antagonisták ciklo-szomatosztatinnal (C-SOM; 250 µg/kg i.p.) kezeltük a TRPV1^{+/+} egereket. Az exogén szomatosztatin hatásának vizsgálata céljából mindkét állatsortban szomatosztatin-14 (SOM-14; 100 µg/kg i.p.) kezelést végeztünk. A C-SOM és a SOM-14 injekciókat is négyszer adtuk, 30 perccel az LPS beadása előtt, majd 6 óránként a 24 órás kísérleti periódus során.

A negyedik kísérletsorozatban a két sst₄ receptor agonista vegyületet (TT-232, J-2156 500 µg/kg i.p.) adtuk mindkét modellben a légzésfunkciós mérés előtt 20 perccel. Más csoportokban, ahol a vegyületek gyulladásgátló hatását is vizsgálni kívántuk, a gyulladással járó folyamatok kialakulása alatt háromszor adtuk: az akut modellben 20 perccel az LPS beadása előtt, majd 8 és 24 órával később; a krónikusban az OVA inhaláció mindhárom napján, az inhaláltatás előtt 20 perccel, 6 és 12 órával később, valamint a mérés előtt 20 perccel.

Légzésfunkciós változások mérése

A légzésfunkciós változásokat 24 órával az LPS kezelést követően, illetve OVA kezelés esetén a 32. napon, Buxco teljes test pletizmográfival (Buxco Europe Ltd, Winchester, UK, 3. ábra) éber, szabadon mozgó állatokon mértük. A hörgőgörcsöt a muszkarin receptor agonista carbachol (50 µl/egér; 5.5; 11; 22.0 mM) növekvő koncentrációinak 1.5 perces inhaláltatásával váltottuk ki. Az inhaláltatást koncentrációnként 15-15 perces mérési periódus követte, melynek végére a megfigyelt paraméterek visszatértek az alaphelyzetbe. A mért paraméter a következményes légúti ellenállás fokozódással egyenesen arányos Penh

(enhanced pause) amely egy számított érték ((enhanced pause) = ((kilégzési idő/ relaxációs idő)-1):(maximális kilégzési áramlás/ maximális belégzési áramlás)).

Szövetteni vizsgálatok és szemikvantitatív morfológiai értékelés

A formalinban fixált, paraffinba ágyazott tüdőmintákból metszeteket készítettünk, majd hematoxin-eosin, illetve a nyáktermelő sejtek láthatóvá tételéhez perjódsvav-Schiff (PAS) festést végeztünk. Az így készült metszeteket fénymikroszkóppal szemikvantitatív pontrendszer alapján értékeltük. Minden tüdőmintából 3 mélységből készítettünk metszeteket, és ezeket átlagoltuk.

Szenzoros neuropeptidok kvantitatív meghatározása tüdőszövetből és plazmából

A fagyasztás után kiolvasztott tüdőmintákat aprítottuk és homogenizáltuk, a homogenizátumot lecentrifugáltuk, az üledéket használtuk a mieloperoxidáz aktivitás meghatározásához, a felülúszót pedig a közvetlen radioimmunoassay-vel (RIA) történő SP, CGRP és szomatosztatin meghatározáshoz. A szomatosztatin koncentrációt a plazmából is meghatároztuk.

Mieloperoxidáz (MPO) aktivitás mérése a tüdőben

A granulociták, különösen a neutrofilek, felhalmozódásának meghatározásához a tüdőmintákban mértük az MPO aktivitást spektrofotometriás módszerrel, 96 lyukú lemezen. A mintában a neutrofil felhalmozódás megállapítható az MPO enzim aktivitás mértéke és egy humán standard MPO preparátum összehasonlításával.

Gyulladásos citokinek kvantitatív meghatározása

A homogenizált tüdőminták IL-1 β , és egyes kísérletekben a TNF- α koncentrációit specifikus ELISA módszerekkel (BD Sciences Eastern Europe) határoztuk meg.

Az sst₄ receptor fehérje immunlokalizációja a tüdőben

A formalinban fixált, paraffinba ágyazott tüdőminták metszetein az antigéneket savas (pH 6) citrát-pufferes, mikrohullámú sütőben történő inkubálással feltártuk. A tárgylemezeket 1:50 hígítású nyúl poliklonális anti-sst₄ antitestekkel inkubáltuk, majd torva peroxidázzal (HRP)-konjugált En Vision rendszerű anti-nyúl másodlagos antitestekkel kezeltük. Végül az sst₄ receptor immunlokalizációját diaminobenzidines (DAB) kezeléssel tettük láthatóvá.

Az sst₄ receptor mRNS meghatározása tüdőben

A tüdőmintákat RNAlater oldatban tároltuk, majd az összes RNS izolálásához GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit-et és proteináz K-t használtunk, a gyártó

utasításai szerint. Az mRNS mennyiségeit a “LightCycler RNA Master SYBR Green I”-val (Roche) adtuk meg, ami egy kvantitatív, valós idejű reverz transzkriptáz-polimeráz láncreakció RT-PCR próba egy Lightcycler rendszeren.

IV. EREDMÉNYEK

IV.1. KAPSAICIN-ÉRZÉKENY ÉRZŐIDEG-VÉGZŐDÉSEK ÉS A GYULLADÁSKELTŐ SZENZOROS NEUROPEPTIDEK SZEREPE AKUT LÉGÚTI GYULLADÁSBAN (Elekes és mtsai, Reg. Pept. 14: 44-54, 2007.)

A tüdő SP és CGRP koncentrációjának változása LPS-sel kiváltott gyulladás hatására

LPS hatására az SP és CGRP koncentráció a tüdőben szignifikánsan növekedett az intakt csoporthoz képest. A nem gyulladt tüdő peptid tartalma az RTX-szel előkezelt egerekben nem mutatott változást. Mindkét peptid endotoxin-indukálta emelkedését kivédte az RTX deszenzitizáció, ami arra utal, hogy a SP és a CGRP koncentrációjának LPS-sel kiváltott emelkedése a kapszaicin-szenzitív idegvégződéseknél köszönhető.

Endotoxinnal kiváltott légzésfunkciós változások

A muszkarin receptor agonista carbachol növekvő koncentrációinak belélegzése (5.5 – 22 mM) koncentrációfüggő bronchokonstriktiót idézett elő. A kezeletlen csoporttal összehasonlítva 24 órával az intranazális LPS kezelést követően a carbachol hatására történő Penh szignifikánsan nagyobb mértékű volt, amely azt igazolja, hogy a kialakult gyulladás bronchiális hiperreaktivitást okoz. A légúti hiperreaktivitás a legmagasabb carbachol koncentráció esetén teljesen megszűnt az RTX-szel előkezelt egerekben, de kisebb carbachol koncentrációknál is 70-80 %-ban alacsonyabb volt, mint az előkezeletlen csoportokban. Az NK1 receptor antagonistá SR 140333, vagy a CGRP1 receptor antagonistá CGRP(8-37) kezelés nem befolyásolta a hiperreaktivitás mértékét az NK2 antagonistá SR 48968 azonban szignifikáns (kb. 35-50 %-os) gátlást idézett elő, amely a két tachykinin receptor antagonistá kombinációjával történő kezelés után sem növekedett.

Szöveti vizsgálatok és pontozás

Az LPS peribronchiális/perivaszkuláris ödémát, intersticiális granulocita felhalmozódást, az alveoláris terekbe mononukleáris sejtek (elsősorban makrofágok)

invázióját, és a nyáktermelő kehely sejtek (goblet sejtek) felszaporodását idézi elő. Az ezekből a paraméterekből kiszámított összetett gyulladásos pontszámok jelentősen magasabbak voltak az RTX-szel előkezelt egerekben. Bár az RTX deszenzitizáció esetén az ödéma nagysága és a makrofágok infiltrációja nem változott, a kehelysejtek száma és a peribronchiális granulociták mennyisége jelentősen megnövekedett az RTX-előkezelt állatokban. Sem az NK1 receptor antagonistá SR 140333-nak, sem az NK2 receptor antagonistá SR 48968-nak nem volt hatása egyik endotoxin-kiváltotta gyulladásos paraméterre sem. Azonban e kettő kombinációja vagy a CGRP1 receptor antagonistá CGRP(8-37) szignifikánsan csökkentette a bronchiolusok körül felhalmozódott granulociták számát. Egyik antagonistával történő kezelés sem befolyásolta az ödéma képződést, a mononukleáris sejtek alveoláris terekbe történő áramlását és a kehely sejtek hiperpláziáját. Ezek az adatok azt jelzik, hogy az LPS-indukálta légúti gyulladás modellben a neurogén gyulladást közvetítő szenzoros neuropeptidok nem játszanak jelentős szerepet a gyulladásos szövettani elváltozásokban.

Mieloperoxidáz aktivitás változása a tüdőben

LPS kezelés következményeképpen a gyulladt tüdőszövetben az akkumulált granulociták mennyiségét jelző MPO aktivitás 2-szeresére emelkedett, RTX előkezelt után azonban LPS hatására ennél szignifikánsan nagyobb, mintegy háromszoros növekedés volt tapasztalható. Sem az NK1 receptor antagonistá SR 140333, sem az NK2 receptor antagonistá SR 48968 nem változtatta meg az LPS-sel kiváltott MPO aktivitásnövekedést, azonban a CGRP(8-37) vagy SR 140333 és SR 48968 kombinációja szignifikánsan csökkentette.

IL-1 β koncentrációjának változása a tüdőben

Az LPS kezelés a gyulladásos citokin IL-1 β tüdőbeli koncentrációjának több, mint 7-szeres növekedését idézte elő, ami RTX-szel előkezelt egerekben szignifikánsan magasabb volt. Sem az NK1 antagonistá SR 140333, sem az NK2 antagonistá SR 48968 önmagában nem befolyásolta szignifikánsan az endotoxin-kiváltotta IL-1 β emelkedést, kombinációjuk ezzel szemben 53 %-os gátlást eredményezett. Figyelemre méltó továbbá, hogy a CGRP1 receptor antagonistá CGRP(8-37) teljesen kivédte az LPS-indukálta IL-1 β szintézist.

A tüdő szomatosztatin koncentrációjának változása LPS-sel kiváltott gyulladás hatására

A nem deszenzitizált egerek intranazális LPS kezelése a tüdő és a plazma szomatosztatin szintjének kétszeres emelkedését idézte elő, amely növekedést a kapszaicin-szenzitív afferensek RTX előkezeltel történő inaktiválása gátolta. A nem gyulladt tüdő

szomatosztatin tartalma az RTX deszenzitizáció után enyhe, nem szignifikáns mértékű csökkenést mutatott.

IV.2. A TRPV1 RECEPTOR SZEREPE AKUT LÉGÚTI GYULLADÁSBAN

(Helyes és mtsai Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. **292**: L1173-1181, 2007.)

Endotoxinnal kiváltott légúti hiperreaktivitás TRPV1^{+/+} és TRPV1^{-/-} egerekben

A carbachollal kiváltott Penh növekedés szignifikánsan nagyobb volt az LPS-kezelt csoportokban a nem gyulladt csoportokhoz viszonyítva, ami a gyulladós bronchiális hiperreaktivitás kialakulását igazolta. A TRPV1 receptor hiánya esetén az LPS-indukálta gyulladásban a maximális Penh értékek magasabbak voltak és a bronchokonstriktió időtartama is hosszabb volt TRPV1^{-/-} egerekben, mint vad típusú megfelelőikben.

Gyulladós változások a tüdőben TRPV1^{+/+} és TRPV1^{-/-} egerekben

A szövettani vizsgálatok és a pontozás azt mutatták, hogy az LPS-sel kiváltott peribronchiális/perivaszkuláris ödéma, a bronchusok körüli granulocita felhalmozódás, a mononukleáris sejtek alveoláris terekbe történő beáramlása és a nyáktermelő kehely sejtek hiperpláziája alapján meghatározott összetett gyulladós pontszám szignifikánsan magasabb volt a TRPV1 receptor génhíányos egerekben, mint azok vad típusaiban.

MPO aktivitás a tüdőben TRPV1^{+/+} és TRPV1^{-/-} egerekben

TRPV1^{+/+} egerek tüdejében az endotoxin kezelés körülbelül kétszeres MPO aktivitásemelkedést idézett elő az intakt csoporthoz viszonyítva. A TRPV1 receptor génhíányos állatokban ez az érték szignifikánsan nagyobb, csaknem négyszerese volt a megfelelő intakt csoportban mért aktivitásnak.

Szomatosztatin koncentráció változása a tüdőben és a plazmában TRPV1^{+/+} és TRPV1^{-/-} egerekben

A szomatosztatinszerű immunreaktivitás alapszintje körülbelül 4-5-ször magasabb a tüdőben, mint a plazmában. LPS kezelés hatására a szomatosztatin-szerű immunreaktivitás a tüdőben és a plazmában is szignifikánsan növekedett TRPV1^{+/+} egerekben. Ezzel szemben a TRPV1^{-/-} csoportban a szomatosztatin koncentráció LPS-indukálta emelkedése a tüdőben sokkal kisebb mértékű volt, a plazmában pedig teljesen elmaradt. Ezen eredményeink arra

utaltak, hogy a szomatosztatin gyulladás során TRPV1 receptor aktiváción keresztül szabadul fel a tüdő kapszaicin-érzékeny rostjaiból és a szisztémás keringésbe kerül.

A szomatosztatin szerepe az endotoxinnal kiváltott légúti hiperreaktivásban, gyulladásos szövettani elváltozásokban és a mieloperoxidáz aktivitásban

SOM-14 (3 x 100 µg/kg i.p.) kezelés a TRPV1^{-/-} és TRPV1^{+/+} egerekben is szignifikánsan gátolta az LPS-sel kiváltott gyulladásos változásokat, az MPO aktivitás növekedését, valamint a légúti hiperreaktivitást. A TRPV1^{+/+} egerekben a ciklo-szomatosztatin (3 x 250 µg/kg i.p.), amely antagonizálja a szomatosztatin hatásait mind az 5 receptor altípuson, jelentősen növelte a bronchiális hiperreaktivitást. TRPV1^{-/-} egerek C-SOM kezelése nem okozott változást sem az LPS-sel kiváltott gyulladásos paraméterekben, sem a bronchiális hiperreaktivásban. Intakt TRPV1^{+/+} és TRPV1^{-/-} egerekben nem tapasztaltunk változást a carbachol-indukálta bronchokonstriktióban, a szövettani paraméterekben és az MPO aktivitásban ismételt SOM-14 kezelés hatására.

IV.3. AZ SST₄ RECEPTOR EXPRESSZIÓJA A TÜDŐBEN ÉS SZEREPE AKUT LÉGÚTI GYULLADÁSBAN

Az sst₄ receptor expressziója ép és gyulladt tüdőben

Ép tüdőben sst₄ receptor immunpozitivitás volt látható a bronchiális epithel sejtek lumen felőli felszínén. Gyulladt tüdőszövetben a megvastagodott epithel rétegben fokozódott az sst₄ festődés és az akkumulálódott mononukleáris sejtek (elsősorban makrofágok) is jellegzetes, erős sst₄ pozitivitást mutattak. A peribronchiális terekben nagy mennyiségben felhalmozódó neutrofil sejteken nem tapasztaltunk immunfestődést. Molekuláris biológiai eredményeink azt mutatták, hogy az sst₄ receptor mRNS jelen van a tüdőben, de a koncentrációja összehasonlítva a β₂-mikroglobulin háztartási gén mRNS szintjével, nem változott meg a gyulladás hatására az endotoxinnal kiváltott pneumonitisz modellben.

Endotoxinnal kiváltott légúti hiperreaktivitás sst₄^{+/+} és sst₄^{-/-} egerekben

LPS-sel kiváltott gyulladásban az sst₄^{-/-} egerekben a carbachol inhaláltatást követően a Penh százalékos változásai szignifikánsan nagyobbak bizonyultak, mint a vad típusú állatokban.

Endotoxinnal kiváltott gyulladási változások $sst_4^{+/+}$ és $sst_4^{-/-}$ egerek tüdejében

A szövettani vizsgálatok és a szemikvantitatív értékelés azt mutatták, hogy az LPS hatására az $sst_4^{-/-}$ egerek tüdejében jelentősen súlyosabb intenzitású gyulladás alakult ki, mint a vad típusúakban: kifejezettebb peribronchiális/perivaszkuláris ödéma és bronchusok körüli granulocita felhalmozódás, fokozottabb mononukleáris sejt infiltráció és goblet sejt hiperplázia volt megfigyelhető.

Mieloperoxidáz aktivitás a tüdőben $sst_4^{+/+}$ és $sst_4^{-/-}$ egerekben

Az LPS kezelés hatására az MPO aktivitás az $sst_4^{-/-}$ csoportban szignifikánsan, közel 2.5-szer nagyobb volt, mint a vad típusú egerekben.

Gyulladási citokinek koncentrációja $sst_4^{+/+}$ és $sst_4^{-/-}$ egerek tüdejében

Az LPS kezelés hatására az IL-1 β és a TNF- α koncentrációjának növekedése az $sst_4^{-/-}$ egerekben kb. duplája volt az $sst_4^{+/+}$ állatokban mért értékeknek.

IV.4. SST₄ RECEPTOR AGONISTA VEGYÜLETEK HATÁSA AKUT ÉS KRÓNIKUS LÉGÚTI GYULLADÁSOKBAN (Elekes és mtsai, Eur. J. Pharmacol. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar>, 2007.)

J-2156 és TT-232 hatása az endotoxinnal kiváltott gyulladási légúti hiperreaktivásra

Carbachol növekvő koncentrációinak (5.5 - 22 mM) belélegeztetésével kiváltott bronhokonstriktiót az 500 μ g/kg i.p. J-2156 és TT-232 szignifikánsan gátolta. A légúti hiperreaktivitást gátló hatás nem csak a 24 óra alatti háromszori injekciót követően volt megfigyelhető, hanem a gyulladás kialakulása után adott egyszeri dózis esetén is, amely arra utal, hogy az sst_4 agonisták fokozott légúti válaszkésztséget csökkentő hatása elsősorban nem a gyulladási reakció gátlásának köszönhető.

J-2156 és TT-232 hatása ovalbuminnal kiváltott gyulladási légúti hiperreaktivásban

Az OVA-val kiváltott légúti gyulladásban jelentősen fokozódott a bronchiális válaszkésztség carbachol növekvő koncentrációival (5.5 - 22 mM) szemben az intakt állatokkal összehasonlítva. A hiperreaktivitást a J-2156 és a TT-232 is körülbelül 50 %-kal gátolta, mind az ismételt (3x500 μ g/kg i.p. naponta 3 napon keresztül) injekciók esetén, mind az egyszeri adás után. Figyelemre méltó, hogy a TT-232-t ismételt alkalmazása után a légúti

hiperreaktivitás teljesen megszűnt és a carbachol-indukálta bronchokonstrikció még kisebb volt, mint az intakt egerekben.

J-2156 és TT -232 hatása endotoxin-kiváltotta akut légúti gyulladásra

Ebben a kísérletsorozatban használt CD1 egerekben is más egértörzsekhez hasonlóan az intranazális LPS alkalmazás peribronchiális/perivaszkuláris ödémát, bronchusok körüli granulocita felhalmozódást, alveoláris terekbe történő mononukleáris sejt (főleg makrofágok) infiltrációt és goblet sejt felszaporodást okozott. Ismételt J-2156 és TT-232 kezelés gátló hatása a makrofág infiltráción kívül a másik három gyulladási paraméter esetében szignifikánsnak bizonyult. A homogenizált tüdőkből mért MPO aktivitás LPS hatására kb. ötszörösére. Ezt a fokozódást a J-2156-tal és a TT-232-vel történő ismételt kezelés is szignifikánsan gátolta.

J-2156 és TT-232 hatása ovalbuminnal kiváltott krónikus légúti gyulladásra

Szenzitized Balb/c egerek tüdejében OVA hatására a bronchusok lumenében és a bronchusok körül is jelentősen felszaporodtak a granulociták (elsősorban eozinofil sejtek), a bronchus nyálkahártya megduzzadt és megnövekedett a nyáktermelés, valamint több helyütt az epithel sejtek pusztulása volt látható. Míg ismételt TT-232 kezelés mindhárom gyulladási paramétert szignifikánsan gátolta, a J-2156 a nyálkahártya ödémát és a nyáktermelést jelentősen csökkentette, de ez a különbség statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak.

A felhalmozódott granulociták mennyiségét jelző MPO aktivitás a tüdőben e krónikus modellben csaknem tízszeresére emelkedett az intakt szövetrel összehasonlítva. Ezt a növekedést mindkét sst₄ agonistával történő ismételt kezelés szignifikánsan csökkentette.

V. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

Kísérleteink szolgáltatták az első bizonyítékot arra, hogy egérben endotoxin indukálta akut légúti gyulladásban a kapszaicin-szenzitív érzőideg-végződésekből felszabaduló neurogén mediátorok (pl. SP, CGRP) tüdőbeli koncentrációja megnövekedik, ezen afferensek resiniferatoxin előkezeléssel történő inaktivációja után LPS kezelés hatására azonban nem fokozódik e peptidek mennyisége. Ezzel szemben az RTX előkezelés e mediátorok alapmennyiségét nem változtatta meg, ami arra utal, hogy a SP és a CGRP jelentős mennyisége található egyéb sejtekben is, mint például a légutak epithel sejtjeiben (Hastings és Hua, 1995), a tüdő neuroendokrin sejtjeiben és immunsejtjeiben (Nelson és Bost, 2004),

melyek nem depletálódnak az RTX előkezelés hatására (Szállási és Blumberg, 1989; Szolcsányi és mtsai, 1990), és ezekhez viszonyítva e peptidek alapkonzentrációja nem gyulladt tüdőben a kapszaicin-szenzitív idegvégződéseknél alacsony. Gyulladásos körülmények között ezen idegvégződéseket gyulladásos mediátorok (protonok, leukotriének, prosztaglandinok, bradikinin, stb.) stimulálják, mely fokozza a neuropeptid szintézist a hátsó gyöki ganglionokban, növeli a periféria felé történő axonális transzportjukat és feltehetően fokozza felszabadulásukat (Baluk és mtsai, 1999). Mivel ép tüdőben a nem neuronális SP, CGRP mennyiséghez képest a neuronális tartalom elenyésző, a gyulladás hatására tapasztalt 30 %-os koncentráció-növekedés jelentős mértékű. Az RTX előkezelés szignifikánsan súlyosbította a légúti gyulladás szövettani paramétereit, a granulocita akkumulációt jelző MPO aktivitást és az IL-1 β termelést is. Kutatásaink igazolták a kapszaicin-szenzitív rostok gyulladásgátló hatását a légutakban, de a gátló mediátorra vonatkozóan nem szolgáltatott kísérletes bizonyítékokat. Más modellekben kapott előzetes eredményeink és az LPS modellben a tüdőben, illetve a plazmában mért adataink alapján feltételezhető, hogy e gátló hatásért elsősorban a tüdő kapszaicin-szenzitív érzőideg-végződéseiből felszabaduló és a keringésbe jutó szomatosztatin a felelős.

A tachykininek és a CGRP szerepét az LPS-sel kiváltott légúti gyulladásban specifikus receptor antagonistáik segítségével vizsgáltuk. Funkcionális jelentőségüket a peribronchiális granulocita akkumulációban, MPO aktivitásban és IL-1 β termelésben sikerült igazolnunk. E gyulladásos paraméterek endotoxin hatására létrejövő növekedését az NK1 és az NK2 receptor antagonisták kombinációjával, illetve a CGRP1 receptor antagonistával történő kezelés csökkentette szignifikánsan. Egyik vizsgált antagonistát, sőt kombinációjuk sem befolyásolta jelentősen az összetett gyulladásos pontszámot, feltehetően azért, mert ennek az értéknek a kiszámításához négy különböző jellemzőt veszünk alapul, melyek között a leukocita felhalmozódás csak az egyik paraméter. A többi három paramétert, a perivaszkuláris ödémát, a makrofág infiltrációt és a nyáktermelő kehely sejtek hiperpláziáját nem változtatta meg egyik kezelés sem. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a gyulladásos szenzoros neuropeptid csak kisebb szerepet játszanak az endotoxin-indukálta légúti gyulladásban.

Az RTX-szel előkezelt egerekben a súlyosabb gyulladás ellenére a bronchiális hiperreaktivitás jelentősen csökkent. Ennek hátterében az állhat, hogy a gyulladásos folyamat kialakulásában döntő jelentőségű a kapszaicin-érzékeny rostokból felszabaduló gátló hatású szenzoros neuropeptid, elsősorban a szomatosztatin védő szerepe, míg a bronchiális válaszkészség fokozódásában priméren a pro-inflammatorikus szenzoros mediátorok játszanak közvetlenül szerepet (Lundberg, 1995). Az endotoxin-kiváltotta légúti gyulladásban

az NK2 receptor antagonist SR 48968 gátolta szignifikánsan a carbachollal kiváltott választ, amely bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy e modellben az NK2 receptoroknak van döntő jelentősége a bronchiális hiperreaktivitásban.

A kapszaicin-érzékeny idegvégződéseken lokalizálódó TRPV1 receptor légúti gyulladásban betöltött szerepét receptor génhányos egerek segítségével vizsgáltuk. Intranazális LPS kezelést követően TRPV1 KO egerekben súlyosabb légúti gyulladásos reakciót és fokozódó bronchiális hiperreaktivitást figyelhettünk meg a tüdőben. E védő hatás hátterében a tüdő kapszaicin-érzékeny afferensein található TRPV1 ioncsatorna gyulladásos mediátorokkal (lipoxigenáz termékek, protonok, prosztaglandinok, bradikinin, stb.) történő aktivációja/szenzitizációja áll, melynek következményeképpen ezen idegvégződésből szomatosztatin szabadul fel, amely a szisztémás keringésbe jut. Ezt a magyarázatot alátámasztják azon eredményeink, hogy az LPS kezelés szignifikánsan megnövelte a szomatosztatin koncentrációját vad típusú egerek tüdejében és a plazmában, azonban a TRPV1^{-/-} csoportban ez elmaradt. A TRPV1 receptor aktivációja tehát nem csak a gyulladásos neuropeptidok (SP, NKA, CGRP) felszabadulását, hanem a tüdő kapszaicin-szenzitív rostjaiban szintén jelen lévő szomatosztatin (Höckfelt és mtsai, 1976) kiáramlását is eredményezi.

A felszabaduló szomatosztatin funkcionális jelentőségére a szomatosztatin receptor antagonist ciklo-szomatosztatinnal nyert adataink szolgáltattak bizonyítékot. A C-SOM, amely mind az öt receptor altípuson (sst₁-sst₅) gátolja a szomatosztatin hatásait, jelentősen megnövelte a gyulladást és a bronchiális hiperreaktivitást vad típusú egerekben, megszüntette a szignifikáns különbséget a KO egerekhez viszonyítva. A szomatosztatin-14 kezelés mindkét csoportban szignifikánsan csökkentette a gyulladásos reakciót és a megnövekedett bronchokonstriktió hajlamot valószínűleg a gyulladáskeltő neuropeptidok felszabadulásának, a monocita-macrophág funkciók és a limfocita proliferáció/citokin termelés gátlásán keresztül (Kolasinski és mtsai, 1992; Pintér és mtsai, 2006).

Elsőként mutattuk ki az sst₄ receptorok expresszióját egér tüdőben immunhisztokémiai és molekuláris biológiai módszerekkel. Az ép, nem gyulladt tüdőben az sst₄ receptor a bronchiális epithel sejtek lumen felőli oldalán lokalizálódtak. Gyulladás hatására azonban a nagy számban beáramló mononukleáris sejtek jelentős sst₄ immunpozitivitást mutattak. Az sst₄ receptor mRNS-ének jelenlétét a tüdőben RT-PCR módszerrel ugyancsak sikerült igazolnunk, azonban az ép és a gyulladt szövetekben mért mRNS koncentrációk között nem volt különbség. Mindezek alapján feltételezhető, hogy az LPS hatására a mononukleáris sejtek már a kész receptorral a felszínükön áramlanak a tüdőbe és a receptor fehérje nem a gyulladt

szövetben szintetizálódik. Ebben a modellben az sst₄ receptor sem a makrofágokon, sem az epithel sejteken nem upregulálódik. Adataink az elsők, amelyek az sst₄ receptor funkcionális jelentőségére utalnak légúti gyulladásban. Az sst₄ receptor hiányában az endotoxinnal kiváltott tüdőgyulladásban az MPO aktivitás, a gyulladásos citokinek mennyisége és a következményes bronchiális hiperreaktivitás nagymértékben fokozódtak, valamint a szövettani paraméterek is súlyosbodtak: a nyáktermelő kehelysejtek száma megnőtt (a szomatosztatin képes csökkenteni a nyák szekrécióját); az akumulálódott mononukleáris sejtek száma ugyan nem volt szignifikánsan nagyobb, azonban aktivitásuk fokozódott, amire a megnövekedett IL-1 β és TNF- α termelés is utal. Mivel a granulocita és bronchiális simaizomsejtek nem mutattak sst₄ immunopozitivitást, a KO egerekben megfigyelhető megnövekedett neutrofil invázió és a légutak fokozott reakciókészsége valószínűleg annak köszönhető, hogy fokozódott a szenzoros idegvégződésekből a gyulladásos neuropeptidek, valamint a mononukleáris sejtekből származó mediátorok felszabadulása.

Utolsó kísérletsorozatunkban morfológiai, biokémiai és légzésfunkciós bizonyítékokat szolgáltatunk arra, hogy az sst₄/sst₁ receptor agonista, heptapeptid TT-232 és az sst₄ szelektív peptidomimetikum J-2156 hatékonyan gátolja a légúti gyulladást és a következményes hiperreaktivitást az endotoxinnal kiváltott akut és az ovalbuminnal kiváltott krónikus egérmodellekben. A két vizsgált agonista mindkét modellben hasonló mértékű gyulladásgátló hatást okozott. Mivel a granulocitákon nincs sst₄ receptor expresszió, a TT-232 és a J-2156 granulocita akumulációt gátló hatása más sejtekből (makrofágok, limfociták) történő kemotaktikus és gyulladáskeltő mediátorok, citokinek, valamint a szenzoros neuropeptidek felszabadulásának csökkentésén keresztül valósulhat meg. Ezt támasztja alá az is, hogy a J-2156 csökkenti izolált peritoneális makrofágokban az LPS hatására történő IL-1 β termelést és *in vivo* az endotoxin modellben a tüdőben mért IL-1 β koncentrációt (Helyes és mtsai, 2006). A krónikus légúti gyulladásban a TT-232 nagyobb mértékben csökkentette a fokozott légúti válaszkészséget, melynek magyarázatául szolgálhat, hogy a TT-232 az sst₄ mellett az sst₁ receptort, valamint két foszfortirozin-foszfátot és néhány fehérje-kinázt is aktivál (Helyes és mtsai, 2005). A gyulladásos reakciók kialakulása után történő egyszeri kezelések is jelentősen gátolták a carbachollal kiváltott bronchokonstriktiót, amely azt jelzi, hogy a hiperreaktivitást csökkentő hatásuk – legalábbis részben - a gyulladásgátló hatástól függetlenül alakult ki. Mindezek alapján stabil, endokrin hatásoktól mentes, szelektív sst₄ receptor agonisták új perspektívákat jelenthetnek a légúti gyulladások és a következményes hiperreaktivitás kezelésében.

A DOLGOZATBAN BEMUTATOTT ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Eredményeink igazolták, hogy egérben endotoxin indukálta akut légúti gyulladásban a kapszaicin-szenzitív érzőideg-végződésekből felszabaduló neurogén mediátorok (pl. SP és a CGRP) tüdőbeli koncentrációja megnövekedik. Bizonyítottuk, hogy ezen afferensek resiniferatoxin előkezeléssel történő inaktivációja után LPS kezelés hatására nem fokozódik e peptidok mennyisége. Az előkezelés azonban e mediátorok alapmennyiségét nem változtatta meg, ami arra utal, hogy a SP és a CGRP jelentős mennyisége található egyéb sejtekben is. Továbbá receptor specifikus antagonistáik segítségével igazoltuk, hogy a gyulladással szoros neuropeptidok csak kisebb szerepet játszanak az endotoxin-indukálta légúti gyulladásban. Eredményeink azt mutatták, hogy endotoxin által kiváltott légúti gyulladásban az NK2 receptor gátlása szignifikánsan csökkentette a carbachollal kiváltott választ, amely bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy e modellben az NK2 receptoroknak van döntő jelentősége a bronchiális hiperreaktivitásban.

2. Igazoltuk, hogy intranazális LPS kezelést követően TRPV1 KO egerekben súlyosabb légúti gyulladással járó reakció és fokozódó bronchiális hiperreaktivitás alakul ki, melynek hátterében az áll, hogy e receptor hiányában a gyulladásgátló hatású szomatosztatin felszabadulása elmarad. Ezt a megfigyelést szomatosztatin antagonistá C-SOM, illetve szomatosztatin agonista SOM-14 segítségével is alátámasztottuk.

3. Immunhisztokémiai és molekuláris biológiai módszerekkel elsőként sikerült bizonyítani a tüdőben sst₄ receptor jelenlétét. Szomatosztatin 4 receptor-génhiányos egerek segítségével, morfológiai és funkcionális vizsgálatokkal ugyancsak elsőként igazoltuk, hogy a kapszaicin-érzékeny afferensekből felszabaduló szomatosztatin a tüdőben az sst₄ receptorokon keresztül fejti ki gyulladásgátló hatását.

4. Biokémiai és légzésfunkciós bizonyítékokat szolgáltatunk arra, hogy az sst₄/sst₁ receptor agonista heptapeptid TT-232 és az sst₄ szelektív peptidomimetikum J-2156 hatékonyan gátolja a légúti gyulladást és a következményes hiperreaktivitást az endotoxinnal kiváltott akut, és az ovalbuminnal kiváltott krónikus egérmodellekben, melynek alapján új terápiás lehetőséget nyújthatnak a tüdő gyulladással járó betegségeinek kezelésében.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni elsősorban Szolcsányi János akadémikus úrnak, aki a kezdetektől fogva támogatta kutató munkámat és mindig teljes figyelemmel volt irántam. Köszönettel tartozom Helyes Zsuzsannának, akinek segítsége, útmutatása, töretlen hite és barátsága mindig óriási szerepet játszott előrehaladásomban, az időnként felmerülő nehézségek leküzdésében. Köszönettel tartozom Pintér Erikának, mert mindig volt néhány jó tanácsa, valamint köszönetemet szeretném kifejezni Szabó Árpádnak, Sándor Katalinnak, Pozsgai Gábornak, Börzsei Ritának, Bagoly Teréznek, Kereskai Lászlónak, Németh Józsefnek és Bánvölgyi Ágnesnek, hogy munkájukkal hozzájárultak kísérleteim teljessé tételéhez, és a barátságos légkör megteremtéséhez, Hírné Perkecz Anikónak a mindig szép metszetekért. Köszönet Dr. Barthó Lóránd professzornak, a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet vezetőjének a támogatásért, és az intézet valamennyi dolgozójának. Külön köszönetemet szeretném kifejezni a Sanofi Aventis Zrt-nek, hogy ösztöndíjam lejárta után sem maradtam támogatás nélkül.

IRODALOM

- Advenier,C., Lagente,V., Boichot,E., 1997. *Eur.Respir.J.* 10, 1892-1906.
- Baluk,P., Thurston,G., Murphy,T.J., Bunnett,N.W., McDonald,D.M., 1999. *Br.J.Pharmacol.* 126, 522-528.
- Barnes,P.J., 2001a. *Allergy* 56, 928-936.
- Bevan,S., Szolcsanyi,J., 1990. *Trends Pharmacol.Sci.* 11, 330-333.
- Davis,J.B., Gray,J., Gunthorpe,M.J., Hatcher,J.P., Davey,P.T., Overend,P., Harries,M.H., Latcham,J., Clapham,C., Atkinson,K., Hughes,S.A., Rance,K., Grau,E., Harper,A.J., Pugh,P.L., Rogers,D.C., Bingham,S., Randall,A., Sheardown,S.A., 2000. *Nature* 405, 183-187.
- Engstrom,M., Tomperi,J., El Darwish,K., Ahman,M., Savola,J.M., Wurster,S., 2005. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 312, 332-338.
- Hastings,R.H., Hua,X.Y., 1995. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 13, 563-569.
- Helyes Z, Pinter E., and Szolcsanyi J. 2005. *Drugs of the Future* 30(6): 558
- Helyes,Z., Pinter,E., Nemeth,J., Sandor,K., Elekes,K., Szabo,A., Pozsgai,G., Keszthelyi,D., Kereskai,L., Engstrom,M., Wurster,S., Szolcsanyi,J., 2006. *Br.J.Pharmacol.* 149, 405-415.
- Hököfelt,T., Elde,R., Johansson,O., Luft,R., Nilsson,G., Arimura,A., 1976. *Neuroscience* 1, 131-136.
- Hoyer,D., Bell,G.I., Berelowitz,M., Epelbaum,J., Feniuk,W., Humphrey,P.P., O'Carroll,A.M., Patel,Y.C., Schonbrunn,A., Taylor,J.E., ., 1995. *Trends Pharmacol.Sci.* 16, 86-88.
- Joos,G.F., De Swert,K.O., Pauwels,R.A., 2001. *Eur.J.Pharmacol.* 429, 239-250.
- Kolasinski,S.L., Haines,K.A., Siegel,E.L., Cronstein,B.N., Abramson,S.B., 1992. *Arthritis Rheum.* 35, 369-375.
- Lagente,V., V, Advenier,C., 1998. *Pulm.Pharmacol.Ther.* 11, 331-340.
- Lundberg JM, 1995. *Can.J.Physiol Pharmacol.* 73, 908-914.
- Maggi,C.A., 1995. *Prog.Neurobiol.* 45, 1-98.
- McDonald,D.M., 1987. *Am.Rev.Respir.Dis.* 136, S65-S72.
- Nelson,D.A., Bost,K.L., 2004. *Front Biosci.* 9, 2166-2176.
- Pinter,E., Helyes,Z., Szolcsanyi,J., 2006. *Pharmacol.Ther.* 112, 440-456.
- Szallasi,A., Blumberg,P.M., 1989. *Neuroscience* 30, 515-520.
- Szolcsanyi J, Bartho L, 1982. *Neurosci.Lett.* 34, 247-251.
- Szolcsanyi J, Pinter E, Helyes Z, 2004. IASP Press, Seattle, pp. 113-128.
- Szolcsanyi,J., 1996. *Prog.Brain Res.* 113, 343-359.
- Szolcsanyi,J., 2004. *Neuropeptides* 38, 377-384.
- Szolcsanyi,J., Bartho,L., Petho,G., 1991. *Acta Physiol Hung.* 77, 293-304.
- Tominaga,M., Caterina,M.J., Malmberg,A.B., Rosen,T.A., Gilbert,H., Skinner,K., Raumann,B.E., Basbaum,A.I., Julius,D., 1998. *Neuron* 21, 531-543.

A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK

1. **Elekes, K.**, Helyes, Z., Nemeth, J., Sandor, K., Pozsgai, G., Kereskai, L., Borzsei, R., Pinter, E., Szabo, A., Szolcsanyi, J.: Role of capsaicin-sensitive afferents and sensory neuropeptides in endotoxin-induced airway inflammation and consequent bronchial hyperreactivity in the mouse. *Regul. Pept.* **141**, 44-54, 2007 (IF.: 2.442).

2. Helyes, Z., **Elekes, K.**, Nemeth, J., Pozsgai, G., Sandor, K., Kereskai, L., Borzsei, R., Pinter, E., Szabo, A., Szolcsanyi, J.: Role of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in endotoxin-induced airway inflammation in the mouse. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **292**, L1173-L1181, 2007 (IF.: 3.939).

3. **Elekes, K.**, Helyes Z., Kereskai L., Sándor K., Pintér E., Pozsgai G., Tékus V., Bánvolgyi A., Németh J., Szűts T., Kéri G., Szolcsányi J.: Inhibitory effects of synthetic somatostatin receptor subtype 4 agonists on acute and chronic airway inflammation and hyperreactivity in the mouse. *Eur. J. Pharmacol.*, 2007 in press, elérhető online <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar>. 2007.09.03. (IF.: 2.522).

A DISSZERTÁCIÓBAN NEM SZEREPLŐ EREDETI KÖZLEMÉNYEK

1. Szolcsányi J., Bölskei K., Szabó Á., Pintér E., Pethő G., **Elekes K.**, Börzsei R., Almási R., Szűts T., Kéri Gy., Helyes Zs., Analgesic effect of TT-232, a heptapeptide somatostatin analogue, in acute pain models of the rat and the mouse and in streptozotocin-induced diabetic hyperalgesia. *Eur. J. Pharmacol.*, **498**,103-109, 2004. (IF: 2.43; FC: 8)

2. Szabó Á., Helyes Zs., Sándor K., Bite A., Pintér E., Németh J., Bánvolgyi Á., Bölskei K., **Elekes K.**, Szolcsányi J., Role of TRPV1 receptors in adjuvant-induced chronic arthritis: *in vivo* study using gene-deficient mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **314**, 111-119, 2005. (IF: 4.31; FC: 4)

3. Bölskei 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**, 368-376, 2005. (IF: 4.56; FC: 10)

4. Varga A., Németh J., Szabó Á., McDougall J.J., Zhang C., **Elekes K.**, Pintér E., Szolcsányi J., Helyes Zs.: Effects of the novel TRPV1 receptor antagonist SB366791 *in vitro* and *in vivo* in the rat. *Neurosci. Lett.* **385**,137-142, 2005. (IF: 2.01; FC: 14)

5. Jakab B., Helyes Zs., Varga, A., Bölskei, 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. *Eur. J. Pharmacol.* **517**, 35-44, 2005. (IF: 2.43; FC: 4)

6. 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. *Eur. J. Pharmacol.* 539, 71-75, 2006. (IF: 2.43; FC: 2)
7. Helyes, Z., Pintér, E., Németh, J., Sándor, K., **Elekes, K.**, Szabó, A., 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. *Br. J. Pharmacol.* 149, 405-415, 2006. (IF: 3.41;)
8. Németh, J., Reglődi, D., Pozsgai, G., Szabó, A., **Elekes, K.**, Pintér, E., Szolcsányi, J., Helyes, Z.: Effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 on sensory neuropeptide release and neurogenic inflammation in rats and mice. *Neuroscience* **143**, 223-230, 2006. (IF: 3.41)
9. Helyes Z., Pozsgai G., Börzsei R., Németh J., Bagoly T., Mark L., Pintér E., Tóth G., **Elekes K.**, Szolcsányi J., Reglődi D.: Inhibitory effect of PACAP-38 on acute neurogenic and non-neurogenic inflammatory processes in the rat. *Peptides*. 2007.
10. Szabó Á., Czirják L., Sándor Z., Helyes Zs., László T., **Elekes K.**, Czömpöly T., Starr A., Brain S., Szolcsányi J. and Pintér E.: Investigation of sensory neurogenic components in bleomycin-induced scleroderma model using TRPV1 receptor and CGRP knockout mice. *Arthritis and Rheumatism* 2007, *in press*

IDÉZHETŐ ABSZTRAKTOK

1. **Elekes K.**, Helyes Zs., Németh J., Sándor K., Kereskai L., Pintér E., Pozsgai G., Szabó Á., Szolcsányi J.: Inhibitory effect of somatostatin released by TRPV1 receptor activation on endotoxin-induced airway inflammation and hyperreactivity in mice
XVth International Conference of Pharmacology, Beijing, China, 2006. (Absztrakt: *Acta Pharmacol. Sin.* 27/Suppl. 1., p. 381, 2006.; IF: 1.13)
2. **Elekes K.**, Németh J., Sándor K., Börzsei R., Beck A., Kereskai I., Pozsgai G., Péter Sz., Pintér E., Szabó Á., Szolcsányi J., Helyes Zs.: Role of the TRPV1 receptor in subacute airway inflammatory model of the mouse.
Neuropeptides, 2005, *in press* (IF: 2.15)
3. Helyes Zs., **Elekes K.**, Sándor K., Kereskai L., Németh J., Pozsgai G., Pintér E., Szabó Á., Szolcsányi J.: Role of capsaicin-sensitive afferents in endotoxin-induced inflammation and hyperresponsiveness of the mouse airways
XVth International Conference of Pharmacology, Beijing, China, 2006. (Absztrakt: *Acta Pharmacol. Sin.* 27/Suppl. 1., p. 106, 2006. (IF: 1.13)

POSZTEREK

1. **Elekes, K.**, Helyes, Zs., Sándor, K., Beck, A., Kereskai, L., Pintér, E., Szabó, Á., Szolcsányi, J.: A heptapeptid szomatosztatin analóg, TT-232, hatásának vizsgálata szubakut légúti gyulladásos egérmódelben.

Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológus Társaság VI. Konferenciája, Debrecen, 2004.

2. **Elekes K.**, Helyes Zs., Németh J., Börzsei R., Sándor K., Beck A., Kereskai L., Pozsgai G., Péter Sz., Pintér E., Szabó Á., Szolcsányi J.: A TRPV1 receptor szerepének vizsgálata egér szubakut légúti gyulladás modellben

Magyar Idegtudományi Társaság Konferenciája, Pécs, 2005.

3. **Elekes K.**, Helyes Zs., Németh J., Sándor K., Kereskai L., Pintér E., Pozsgai G., Szabó Á., Szolcsányi J.: Kapszaicin-érzékeny érzőideg végződésének szerepe endotoxinnal kiváltott légúti gyulladásban

Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság Klinikai Farmakológiai Kongresszus és Immunfarmakológiai Konferencia Debrecen, 2005.

4. **Elekes K.**, Pozsgai G., Pintér E., Németh J., Sándor K., Szabó Á., Engström M., Wurster S., Szolcsányi J., Helyes Zs.: Szelektív szomatosztatin sst₄ receptor agonista J-2156 hatásának vizsgálata légúti gyulladásos egérmódelben

Magyar Farmakológiai Társaság Experimentális Szekciójának II. vándorgyűlése

Pécs, 2006.

5. Helyes Zs., **Elekes K.**, Sándor K., Pozsgai G., Németh J., Pintér E., Szabó Á., Szolcsányi J.: A kapszaicin-érzékeny érzőideg végződésének és a TRPV1 kapszaicin receptor szerepének vizsgálata akut és krónikus légúti gyulladás modellekben

Magyar Gyulladásbiológiai Társaság I. Ülése, Balatonöszöd, 2006.

6. **Elekes K.**, Németh J., Sándor K., Börzsei R., Beck A., Kereskai L., Pozsgai G., Péter Sz., Pintér E., Szabó Á., Szolcsányi J., Helyes Zs.: Role of the TRPV1 receptor in subacute airway inflammatory model of the mouse.

European Neuropeptide Club, 15th Annual Meeting, Riga, Lettország, 2005.

7. Helyes Zs., **Elekes K.**, Németh J., Sándor K., Börzsei R., Beck A., Kereskai L., Pozsgai G., Péter Sz., Pintér E., Szabó Á., Szolcsányi J.: TRPV1 receptor-mediated release of the inhibitory neuropeptide somatostatin in murine airway inflammatory model.

Summer Neuropeptide Conference, Miami Beach, Florida, USA, 2005.

8. **Elekes K.**, Helyes Zs., Németh J., Sándor K., Kereskai L., Pintér E., Pozsgai G., Szabó Á., Szolcsányi J.: Inhibitory effect of somatostatin released by TRPV1 receptor activation on endotoxin-induced airway inflammation and hyperreactivity in mice

XVth International Conference of Pharmacology, Beijing, China, 2006.

9. Helyes Zs., **Elekes K.**, Sándor K., Kereskai L., Németh J., Pozsgai G., Pintér E., Szabó Á., Szolcsányi J.: Role of capsaicin-sensitive afferents in endotoxin-induced inflammation and hyperresponsiveness of the mouse airways

XVth International Conference of Pharmacology, Beijing, China, 2006. (Absztrakt: Acta Pharmacol. Sin. 27/Suppl. 1., p. 106, 2006.

ELŐADÁSOK

1. **Elekes K.**, Németh J., Sándor K., Börzsei R., Beck A., Kereskai L., Pozsgai G., Péter Sz., Pintér E., Szabó Á., Szolcsányi J., Helyes Zs.: TRPV1 receptor aktivációjával felszabaduló szomatosztatin hatása légúti gyulladássos egérmodellben

Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság, a Magyar Experimentális Farmakológia Tavaszi Szimpóziuma, Budapest, 2005.

2. **Elekes K.**, Pozsgai G., Sándor K., Keszthelyi D., Kereskai L., Pintér E., Szabó Á., Szolcsányi J., Helyes Z.: Szomatosztatin 4 receptor (sst₄) szerepe az endotoxinnal kiváltott légúti gyulladásban

Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság, a Magyar Experimentális Farmakológia Tavaszi Szimpóziuma, Budapest, 2007.